

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

ANNÉE 1930-1931

N° 22

**Influence du nombre des microbes
ensemencés sur la multiplication
du bacille pyocyanique
dans un milieu de culture liquide.**

THÈSE

pour l'obtention du Diplôme de

Docteur de l'Université de Paris
(PHARMACIE)

présentée et soutenue le 25 Juin 1931

PAR

Alice KAPLAN-BRILLE

PHARMACIEN

EX-INTERNE DES HÔPITAUX DE PARIS

MM. RADAIS, *Président*
COUTIÈRE, *Professeur*
RÉGNIER, *Agrégé.*

PARIS

IMPRIMERIES VIEUVE
16, RUE DE LA GLACIÈRE, 16

1931

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

ANNÉE 1930-1931

N° 22

**Influence du nombre des microbes
ensemencés sur la multiplication
du bacille pyocyanique
dans un milieu de culture liquide.**

THÈSE

pour l'obtention du Diplôme de

**Docteur de l'Université de Paris
(PHARMACIE)**

présentée et soutenue le 25 Juin 1931

PAR

Alice KAPLAN-BRILLE

PHARMACIEN

EX-INTERNE DES HÔPITAUX DE PARIS

MM. RADAIS, *Président*

COUTIÈRE, *Professeur*

RÉGNIER, *Agrégé.*

PARIS

IMPRIMERIES VIEILLEMARD

16, RUE DE LA GLACIÈRE, 16

1931



PERSONNEL DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE

ADMINISTRATION

MM. RADAIS, Doyen, O. ,  I.
PERROT, Assesseur, O. ,  I.
G. DURSANT, Secrétaire, ,  I.

PROFESSEURS

MM. RADAIS, O. ,  I. Cryptogamie et Microbiologie.
BÉHAL, Membre de l'Institut
G.O. ,  I. Chimie organique.
PERROT, O. ,  I. Histoire naturelle des Médicaments.
COUTIÈRE, O. ,  I. Zoologie.
LEBEAU, O. ,  I. Pharmacie chimique.
GUERBET, ,  I. Toxicologie.
BOUGAULT, ,  I. Chimie analytique.
GORIS, ,  I. Pharmacie galénique.
GUÉRIN, ,  I. Botanique générale.
TASSILLY, ,  I. Physique.
DAMIENS, ,  I. Chimie générale.
HÉRISSEY, O. ,  I. Chimie biologique.
SOMMELET, ,  I. Hydrologie et Hygiène.

Professeurs sans chaire : MM. LUTZ, ,  I., LAUNOY, O. ,  I.

Professeurs honoraires : MM. A. VILLIERS, ,  I., GRIMBERT, ,  I.,
et DÉLÉPINE, O. ,  I.

CHARGÉS DE COURS

MM. Marc HONNORAT, ,  I. Législation et Déontologie pharmaceutiques
LUTZ, ,  I. Cryptogamie.
LAUNOY, O. ,  I. Pharmacodynamie.
FABRE, ,  I. Minéralogie.

AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM. DELABY, ,  I., PICON, ,  I., FABRE, ,  I., MASCRÉ, ,  I.,
FLEURY ,  I., BACH, ,  I., BEDEL, ,  I., RÉGNIER ,  I.

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. BEDEL, ,  I., agrégé, chargé des T.P. de 1^{re} année Chimie générale.
FABRE, ,  I., et RÉGNIER ,  I., agrégés, chargés
des travaux de Chimie analytique
SOUÈGES, ,  I. Micrographie.
LEROUX, ,  I. Physique.
DEVAL, ,  I. Microbiologie.
DELABY, ,  I., PICON, ,  I. et FLEURY, ,  I.
agrégés, chargés des Travaux généraux de 4^e année.

Bibliothécaire en Chef : M. BEAULIEUX, ,  I.

A LA MÉMOIRE DE MA MÈRE

A LA MÉMOIRE DE MON PÈRE

A MON MARI

A MA FAMILLE

A MES AMIS

A MONSIEUR LE PROFESSEUR RADAIS

Doyen de la Faculté de Pharmacie,

Membre de l'Académie de Médecine,

*qui me fait l'honneur d'accepter la prési-
dence de cette thèse, en témoignage de ma
profonde reconnaissance et de mon respec-
tueux dévouement.*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR COUTIÈRE

Membre de l'Académie de Médecine,

*en hommage de ma gratitude et de mon
profond respect.*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ J. RÉGNIER

Pharmacien des Hôpitaux,

*qui m'a inspiré le sujet de cette thèse et
m'a constamment prodigué ses conseils, en
témoignage de mes sentiments de très vive
reconnaissance et de mon entier dévouement.*



INTRODUCTION

Dès le début des découvertes bactériologiques, les travaux sur les micro-organismes ont été orientés vers des fins pratiques et plus spécialement thérapeutiques. Les premiers auteurs, considérant la bactériologie « par la fenêtre de la médecine », ont étudié la forme des agents pathogènes, puis ils ont tenté de guérir et de protéger l'homme et les animaux.

Les merveilleux résultats que ces auteurs, et leurs successeurs, ont obtenus, montrent bien qu'ils ont eu raison d'aller au plus pressé. Pourtant ils ont, dans leur hâte, négligé d'étudier un certain nombre de problèmes qui s'avèrent maintenant comme des plus importants.

Aussi, depuis quelques années, ont commencé des travaux, de tendance plus théorique, ayant pour but de comprendre, grâce à la chimie, l'évolution vitale des microorganismes ; d'étudier, suivant les conditions extérieures, l'évolution de leur forme, forme bien moins rigide que ne pensaient les précédents auteurs ; et, enfin, de chercher à connaître l'importance, pour des cellules situées à la limite du visible, s'en échappant même quelquefois, des phénomènes physiques qui règlent la vie des molécules ou dirigent les processus colloïdaux.

En France, quelques auteurs, à l'étranger, des travailleurs plus nombreux, ont donc abordé l'étude biologique des microorganismes. Leurs recherches sont assez pénibles ; les techniques histologiques, chimiques ou physiques, manquent de finesse. Ces « ferments figurés », qui pouvaient paraître simples aux bactériologistes, présentent une vie fort complexe. Des facteurs, dont l'importance et même la nature nous échappent encore, viennent, sans cesse, agir sur eux et modifier leur genre de vie.

Il est pourtant nécessaire de persévérer dans cette voie. Dès maintenant de beaux résultats pratiques, où la médecine a finalement trouvé son compte, ont été obtenus, et il est à prévoir que, dans un temps peut-être assez proche, nous pourrons agir sur la vie même des microorganismes, freinant leur multiplication ou la stimulant selon les besoins, modifiant dans un sens favorable à la vie humaine leurs actions fermentaires, et peut-être aussi leur pouvoir pathogène.

Pour nous, au laboratoire de M. le Professeur RADAIS, sur les conseils de M. RÉGNIER, nous avons voulu simplement étudier l'influence, sur la multiplication du Bacille pyocyanique, d'un seul facteur : le nombre des microbes ensemencés.

Au même laboratoire, nos camarades ont poursuivi ou poursuivent des études parallèles, et cherchent à connaître l'influence d'autres facteurs tels que la qualité et la quantité des substances nutritives mises à la disposition des microorganismes, l'influence des ions, etc... Ainsi pouvons-nous avoir l'espoir de connaître, dans quelques années, *de quelle façon évolue une culture bactérienne normale, en fonction des conditions d'ensemencement et de milieu*. C'est, semble-t-il, le problème le plus simple que l'on puisse se poser à l'heure actuelle.

Jean RÉGNIER et Suzanne LAMBIN, en 1927, cherchant à aborder l'étude quantitative de l'action des antiseptiques, ont été amenés à mettre au point des méthodes de numération des bactéries. Puis ils ont voulu suivre numériquement l'évolution d'une poussée bactérienne normale. Utilisant une technique de numération microscopique directe des germes, ils n'ont pas, à leur étonnement, retrouvé la phase de latence constatée, par tous les auteurs, au début de la multiplication microbienne. Ils pensèrent qu'il était peut-être possible d'expliquer cette anomalie par la grandeur du nombre des microbes qu'ils ensemençaient. A leur suite, nous fûmes donc amenée à reprendre ces recherches et à chercher quelle était *l'influence du nombre des microbes ensemencés sur l'évolution bactérienne normale*. Ce sont les résultats obtenus dans cette étude, effectuée avec le Bacille pyocyanique, que nous exposerons dans les lignes suivantes.

Dans le *premier chapitre*, nous passerons rapidement en revue les nombreuses techniques de numération proposées par les divers auteurs, et nous en montrerons, autant que possible, les avantages et les inconvénients.

Dans le *deuxième chapitre*, nous donnerons un exposé chronologique des principaux travaux effectués par les auteurs étrangers sur la croissance microbienne.

Nous indiquerons comment on peut, d'après ces auteurs, envisager à l'heure actuelle, l'évolution de la poussée bactérienne et la diviser en un certain nombre de phases distinctes.

Dans le *troisième chapitre*, nous exposerons le détail des techniques que nous avons employées pour effectuer nos essais :

- 1°) Numération microscopique de tous les microbes visibles ;
- 2°) Numération sur plaques de gélose des colonies, c'est-à-dire des microbes capables de se reproduire dans ces conditions.

Après avoir indiqué la marche suivie pour nos expériences, nous donnerons en détail les résultats obtenus avec les divers ensemencements. Ceux-ci ont varié de 250.000 à 10 milliards de microbes par cm^3 .

Enfin, dans le *quatrième chapitre*, nous comparerons entre eux les résultats obtenus. Nous exposerons d'abord les conclusions générales, s'appliquant à toutes nos expériences ; puis celles plus particulières, résultant des différences dans la grandeur des nombres de microbes ensemencés.

Au moment où nous achevons ce travail, nous tenons à remercier ici tous ceux qui, au cours de nos études, nous ont témoigné leur sollicitude.

Nous sommes particulièrement heureuse de pouvoir exprimer notre respectueuse reconnaissance à M. le Professeur RADAI, dont l'enseignement nous a été si profitable, qui nous a accueillie comme moniteur aux Travaux Pratiques de Microbiologie, puis dans son laboratoire de recherches, et a toujours facilité notre tâche par sa bienveillance et ses précieux conseils.

Nous ne savons comment exprimer à M. L. DEVAL, chef de Travaux Pratiques à la Faculté, notre gratitude et notre affectueux dévouement. Depuis dix ans, il n'a cessé de nous témoigner sa bonté. Nous n'oublions pas que c'est lui qui nous a appris les premières notions de bactériologie et que c'est de lui que nous tenons les connaissances qui nous ont permis d'aborder ce travail.

A M. E. ANDRÉ, pharmacien des Hôpitaux, nous sommes heureuse aussi d'apporter nos remerciements pour l'accueil qu'il nous a réservé dans son service et pour tout ce qu'il nous a appris pendant nos années d'internat.

C'est M. J. RÉGNIER, professeur agrégé, pharmacien des Hôpitaux, qui nous a inspiré le sujet de ce travail et qui nous a constamment guidée au cours de nos recherches. Qu'il nous soit permis de lui exprimer ici un peu de notre profonde reconnaissance et de notre très sincère attachement.

Nous tenons également à remercier nos camarades M. R. DAVID et Mlle S. LAMBIN pour leur amicale collaboration.

CHAPITRE I

TECHNIQUES UTILISÉES POUR L'ÉTUDE QUANTITATIVE DE LA POUSSÉE BACTÉRIENNE

De très nombreux auteurs ont proposé des méthodes diverses pour évaluer le nombre de microbes existant dans un volume déterminé de suspension bactérienne.

Certains ont effectué des mesures de volumes ou de poids, mais ces mesures sont difficiles et longues et jusqu'à un certain point peu exactes.

La plupart ont employé des méthodes basées sur des principes différents ; les uns ont compté tous les microbes visibles présents dans un petit volume de la culture ; d'autres ont évalué le degré d'opacité d'une suspension microbienne ; ils ont obtenu par ces deux méthodes le nombre total de microbes, somme des microbes vivants et des microbes morts. D'autres, encore, très nombreux, ont compté exclusivement les microbes qu'ils appelaient « vivants », par numération sur milieux de culture solidifiés (1).

Il faut enfin mentionner les méthodes basées sur l'activité biochimique des bactéries.

I. — MÉTHODES DONNANT LE NOMBRE TOTAL DES MICROBES (MORTS ET VIVANTS) PRÉSENTS DANS LA CULTURE

A. — Mesure du volume des masses microbiennes.

Par centrifugation, on sépare les microbes du milieu de culture et on les collecte dans des tubes spécialement gradués. Du volume, lu après centrifugation, on déduira le nombre de cellules microbiennes.

(1) Nous tenons, dès le début de notre exposé, et pour éviter tout malentendu, à définir le terme de *vivant*.

Tous les auteurs qui ont procédé à des numérations microbiennes indirectes, comptant les colonies développées sur bouillon solidifié, ont dénommé « vivants » les microbes ainsi dénombrés. Pour eux, les microbes incapables de se multiplier dans les conditions de leurs essais étaient « morts ».

Nous verrons, au cours de notre exposé, que cette vue est inexacte. Des microbes, incapables de résister à un transport et à un repiquage sur milieux solidifiés, ou incapables de proliférer dans des conditions relativement peu favorables, peuvent fort bien se multiplier dans les milieux liquides plus favorables où on les a placés ou dans lesquels ils ont pris naissance. Le terme de *vivant*, si l'on prend comme test, pour les microbes, la propriété de se multiplier, doit donc s'appliquer encore à ces microbes moins vigoureux.

Le choix de la propriété de se multiplier semble logique pour définir la *vie* microbienne. Les autres propriétés, choisies généralement pour définir la *vie* des organismes supérieurs, comme l'exercice des fonctions métaboliques, peuvent, dans le cas microbien, par suite de la mise en liberté des ferments, subsister pendant un certain temps même après la disparition des corps bactériens. Il semble donc peu logique de choisir ces dernières propriétés, subsistant un certain temps après la disparition des organismes, comme test de leur *vie*.

Cette méthode a été utilisée par PAINE (77) (1911), CARLSON (17) (1913), et SLATOR (98) (1921) l'a employée pour estimer le nombre d'éléments dans les cultures de levures.

Il faut pour cette opération disposer d'une centrifugeuse à grande vitesse (au moins 7.000 tours à la minute) et prolonger le temps de centrifugation au moins pendant 15 minutes.

B. — Mesure du poids des masses microbiennes.

Cette méthode se rapproche beaucoup de la précédente. Il suffit de substituer à la mesure du volume obtenu après centrifugation, l'évaluation du poids du « culot microbien ».

SABOURAUD (89), pour le titrage des vaccins à staphylocoques, après une première centrifugation, un lavage au sérum physiologique et une deuxième centrifugation, enlève à la pipette tout le liquide possible et pèse le résidu, estimant qu'ainsi « le culot renferme sensiblement 500 millions de cocci par milligramme ».

Cette approximation, convenant peut-être pour titrer des vaccins, ne paraît pas pouvoir suffire pour les numérations des expériences de poussée microbienne.

Il est préférable d'effectuer plusieurs lavages à l'eau distillée pour éliminer les substances adsorbées et de dessécher le culot microbien à poids constant. C'est cette dernière technique qu'a utilisée FRED VLÈS (103) dans les expériences instituées pour contrôler les recherches opacimétriques dont nous parlerons plus loin.

Ces deux méthodes, basées sur la centrifugation, peuvent subir quelques critiques, dues surtout à l'emploi de l'eau distillée comme liquide de lavage. Il semble en effet que celle-ci puisse, soit provoquer la bactériolyse de quelques éléments microbiens, soit surtout modifier plus ou moins profondément leur texture et leur densité et ainsi empêcher une centrifugation complète. F. VLÈS (103) a estimé que cette erreur était considérable. Aussi a-t-on proposé de remplacer l'eau distillée par du sérum physiologique.

C. — Evaluation du trouble apporté aux milieux liquides par la masse microbienne.

Tout bactériologiste a l'habitude d'estimer grossièrement l'importance d'une poussée microbienne ou d'une suspension bactérienne par le trouble qu'apporte au liquide la masse des microbes.

Ce procédé empirique, modifié, perfectionné, a été employé par de nombreux auteurs pour étudier de façon précise les émulsions bactériennes et en déduire aussi exactement que possible le nombre de bactéries qu'elles renfermaient.

BOLAND (7) (1902), DAVISON (26) (1916), HARVEY (46) (1919), GATES (40) (1920), DREYER, DUNCAN et GARDNER (29) (1918), DERNBY et AVERY (27) (1918), AVERY, GLENN et CULLEN (3) (1919), PORCELLI-TITONE et GOSIO (80) (1917), LÉOPOLD ROBERT (87) (1921), HANS HECKSCHER (48) (1921) ont proposé des techniques

différentes, les unes, simples « tours de main », ou procédés de laboratoire (par exemple visibilité d'un signe quelconque ou d'une anse de platine dans la suspension microbienne), les autres plus intéressantes et plus précises (néphélémétrie, opacimétrie, comparaison avec des séries de tubes témoins).

C'est un auteur français FRED VLÈS (104), *qui a fait l'étude la plus scientifique de la méthode* destinée à mesurer le trouble des suspensions bactériennes.

C'est à propos du vaccin antityphique que préparait H. VINCENT, au Val-de-Grâce, pendant la guerre, que VLÈS s'est attaché à mettre au point un appareil opacimétrique capable de doser rapidement et avec précision la teneur en « substance bactérienne » du vaccin.

Nous ne pouvons nous étendre longuement sur ses recherches et ses travaux qui ont été poussés à un degré de précision tel qu'il semble difficile, au moins pour le moment, de faire mieux.

En ce qui concerne plus particulièrement les points qui nous occupent, VLÈS a montré que pour les mesures opacimétriques et néphélémétriques, il fallait employer une lumière monochromatique (de préférence vers l'extrémité rouge du spectre). Il a construit deux appareils, d'abord un « opacimètre à polarisation », puis en 1917, un « opacimètre à écran progressif », qui furent gradués expérimentalement, après numération microscopique directe, en « nombre de bacilles typhiques par centimètre cube ».

Pourtant, malgré la précision obtenue, les méthodes précédentes, mesure du volume, du poids ou de l'opacité bactérienne, se heurtent à quelques difficultés d'ordre général.

a) Il y a toujours, adsorbée par le microbe, une certaine quantité de substances salines ou colloïdales. Et nous avons déjà vu quelles difficultés se présentent si on cherche à laver les microbes.

b) Dans certaines circonstances, le volume, le poids et les propriétés optiques des bactéries varient par absorption d'eau ou au contraire par déshydratation.

c) Enfin, ces méthodes très utilisables pour titrer des vaccins, préparés avec des colonies microbiennes obtenues sur milieu solide, s'adaptent mal à nos propres recherches. Notre intention est de suivre pendant de nombreux jours la multiplication microbienne dans un milieu de culture *liquide*, et nos mesures seront infailliblement gênées, puis rendues impossibles par les troubles, les précipités qui se produiront dans le milieu même par suite de l'activité de la bactérie. Certains auteurs avaient déjà été arrêtés par ces difficultés : DERNEY et AVERY (27), par exemple, ont dû limiter l'emploi du néphélémètre à une zone de pH assez restreinte.

D. — Evaluation de la quantité de colorant absorbée par les organismes microbiens.

ZELIKOW (112) (1906) a proposé d'estimer la quantité de bactéries contenues dans une suspension bactérienne en mesurant la quantité de colorant (fuchsine) absorbée par ces organismes. La concentration du colorant était déterminée avant et après absorption au moyen d'un colorimètre

de Duboscq. Il nous semble difficile d'admettre que cette technique puisse donner des résultats exacts, car la quantité de colorant absorbée dépend surtout de phénomènes d'adsorption complexes et variables avec la qualité du milieu et avec l'état (vitalité, âge) que présentent les microbes.

E. — Numération microscopique des éléments microbiens.

Cette numération se fait par deux types de techniques.

Dans la première on fait au microscope une *numération directe* des bactéries.

Dans la seconde, on procède à une *numération microscopique indirecte* en déterminant, dans un mélange d'émulsion bactérienne et d'émulsion titrée d'éléments figurés assez gros, la *proportion relative* des bactéries et des éléments figurés.

1°) EVALUATION DU NOMBRE DES MICROBES PAR NUMÉRATION MICROSCOPIQUE DIRECTE.

a) *Numération au microscope, après coloration, du nombre total de microbes contenus dans une quantité connue de suspension bactérienne aussi faible que possible.*

KLEIN (60) en 1900, poursuivant ses travaux sur les désinfectants, et sur la coloration des bactéries en milieu sec et en milieu humide, fut amené à appliquer ses remarques à la numération de ces éléments.

C'est lui qui, le premier, mit au point cette technique, et nous croyons utile de rapporter ici sa propre description des opérations à effectuer, les autres auteurs et KLEIN lui-même plus tard, ayant tous travaillé sur cette base en y apportant diverses modifications.

« Dans un verre de montre, on place une quantité connue (par exemple 1/2 cc.) d'une culture liquide ou d'une émulsion de culture solide dans l'eau physiologique et une quantité égale de violet de gentiane en solution aqueuse anilinée. Les deux liquides sont mélangés pendant quelques minutes à l'aide d'une anse de platine. Après 2 ou 3 minutes, les bactéries sont déjà très intensément colorées. On prélève à ce moment une partie connue du mélange à l'aide d'une anse de platine *jaugée* et on l'étale uniformément sur une lamelle. On laisse la préparation sécher à l'air, on la passe 2 ou 3 fois à la flamme et on l'inclut dans le xylol, ou le baume du Canada. Les bactéries apparaissent, au microscope, fortement colorées. L'examen de la surface totale de la lamelle n'est pas nécessaire. Il suffit d'effectuer la numération sur une cinquantaine de champs microscopiques, de prendre la moyenne des chiffres trouvés. Par un simple calcul, en considérant la capacité de l'anse de platine, la surface de la lamelle et la surface du champ microscopique, on connaît le nombre de bactéries contenues dans un centimètre cube de la suspension microbienne. »

HEHEWERTH (50) (1901) étudia avec un soin scrupuleux la méthode de KLEIN, et modifia un peu la technique. C'est ainsi qu'il donna quelques indications pratiques sur l'étalement du liquide qui doit être fait rapi-

dement, sans atteindre la dessiccation, sur la coloration, et sur la capacité des anses de platine, en fonction de la surface des lamelles.

EIJKMAN (31) (1904), THÖNI et THAYSEN (101) (1915) employèrent cette méthode après mélange de l'émulsion à la gélatine, de façon à avoir une répartition plus égale des éléments microbiens.

HUGO SELTER (90 bis) (1916), BREED et BREW (8) (1916) utilisèrent également la technique de KLEIN, avec de légers changements dus aux divers microbes qu'ils étudiaient et aux buts différents qu'ils poursuivaient.

En 1916, ALEX. KLEIN (61) reprit les recherches commencées en 1900. Basée sur le même principe, sa technique a subi quelques modifications plus ou moins inspirées des travaux cités plus haut : « L'émulsion microbienne est placée pendant plusieurs heures dans un agitateur électrique, puis colorée avec du violet de méthyle pendant 5 minutes, d'abord à la température du laboratoire, puis au bain-marie à 37°. On y ajoute alors de la gélatine liquéfiée et on mélange le tout avec une anse de capacité connue. On étale cette émulsion sur une lamelle ronde de 15 mm. de diamètre. On dessèche la préparation sans flamber ni laver et on l'inclut dans du baume du Canada. On compte les microbes dans 100 champs du microscope. On fait la moyenne et en multipliant ce nombre moyen par une formule, où figurent le rayon de la lamelle, le rayon du champ microscopique et la capacité de l'anse de platine, on a le nombre des microbes contenus dans 1 cm³ d'émulsion ».

HANS HECKSCHER (47) présenta en 1921 une technique basée sur les mêmes principes, avec quelques modifications. Il employait en particulier une pipette compte-gouttes ou à graduation capillaire, au lieu d'une anse jaugée.

HENRICI (52) en 1923 proposa à son tour un procédé de numération des cellules bactériennes, permettant en même temps de différencier et par conséquent de compter les cellules mortes et les cellules vivantes. Nous aurons occasion d'étudier à nouveau ce procédé.

HENRIQUES (56) en 1923 perfectionna encore la méthode. Pour stabiliser la suspension il utilisa de la gomme arabique. Cette addition de colloïde lui permit d'utiliser des pipettes capillaires graduées, car le colloïde empêchait dans la pipette la formation d'un courant central plus riche en bactéries.

La méthode mise au point par KLEIN en 1900 a donc été depuis très perfectionnée par KLEIN lui-même et par les autres chercheurs qui lui attribuèrent une précision très grande.

Et pourtant, il semble bien que ce procédé comporte une cause d'erreur qui est variable, mais qui est parfois très grande. La plupart des auteurs se sont en effet servis d'une anse de platine jaugée. Il semble qu'il soit très difficile d'avoir une anse très rigoureusement calibrée et la moindre erreur prend de grandes proportions, étant donné le faible volume du liquide transporté. D'autre part, il est difficile d'être certain que tout le liquide chargé de microbes a bien été déposé sur la lamelle et que l'« essuyage » de l'anse a été parfait.

Et enfin, la quantité de suspension bactérienne transportée variera avec les qualités physiques du liquide : tension superficielle, viscosité. Ces qualités physiques varient non seulement avec les divers milieux, mais pour un même milieu, avec l'évolution de la poussée microbienne.

Ce fait, déjà signalé par KOPACZEWSKI pour la tension superficielle, a été retrouvé par R. DAVID (25 bis), au laboratoire de Bactériologie de la Faculté de Pharmacie.

C'est pourquoi il nous a semblé impossible d'utiliser la méthode de KLEIN pour suivre la poussée microbienne dans un milieu déterminé. Il est évident que pour titrer des vaccins, cette méthode serait parfaitement utilisable.

b) Numération des microbes contenus dans un volume très petit mais exactement connu de suspension bactérienne à l'aide d'une chambre de numération.

Ce deuxième procédé de *numération directe* n'a été mis au point que dans ces dernières années, car il dépend surtout de la précision des appareils qui sont de fabrication plus délicate encore que celle des hématimètres ordinaires.

En 1914, E. GLYNN, M. POWEL, A. REES et G. L. COX (41), comparant pour le dosage des vaccins, diverses méthodes de numération, ont étudié en particulier ce procédé.

Ils ont précisé les détails de technique et ont notamment recommandé d'employer des cellules peu profondes (1/50 de millimètre), la profondeur des chambres hématimétriques ordinaires étant de 1/10 de millimètre.

FRED VLÈS (104) (1921), HENRICI (51) (1921), TROESTER (102) (1922) ont aussi utilisé ce procédé avec des variantes et des perfectionnements.

Cette technique est évidemment une des meilleures que l'on puisse employer. Lorsque l'appareil dont on dispose est exact, sa précision ne dépend que du soin avec lequel est faite la numération.

Il existe pourtant une difficulté, que l'on ne retrouve pas quand il s'agit des globules rouges du sang : alors que les hématies, relativement lourdes se sédimentent vite, les microbes au contraire ne se déposent que très lentement. Il est donc très difficile d'avoir au point à la fois tous les microbes et la graduation. C'est pour éviter cet inconvénient que TROESTER employait une graduation objective fixe, et que GLYNN, POWEL, REES et COX ont diminué la profondeur de la cellule. D'autre part, il n'est pas absolument certain que tous les microbes apparaissent avec netteté. Il est fort possible qu'un certain nombre d'entre eux, non colorés (ou mal colorés par une trace de colorant) échappent à la numération.

Nous aurions cependant volontiers utilisé cette méthode, mais nous n'avons eu à notre disposition que trop tard, tout à la fin de notre travail, le « compte-microbes » de la maison Jouan.

2°) EVALUATION DU NOMBRE DES MICROBES PAR NUMÉRATION MICROSCOPIQUE INDIRECTE.

Le principe de cette méthode a été mis au point en 1902, pour la première fois par le bactériologiste anglais WRIGHT (109) pour la numération des germes contenus dans un vaccin microbien :

Etant donné que l'on connaît le nombre des hématies contenues dans 1 mm³ de sang humain, si on mélange de façon homogène un volume de ce sang et un volume égal d'une suspension microbienne et si on déter-

mine la fréquence *relative* des bactéries et des globules sanguins, il suffit d'un calcul très simple pour connaître la quantité de microbes contenus dans 1 mm³ de l'émulsion bactérienne.

L'auteur, pour effectuer la numération relative des hématies et des microbes, étalait sur une lame, à l'aide d'une autre lame ou d'une lamelle, une goutte du mélange microbes-sang. Il laissait sécher, fixait dans une solution de bichlorure de mercure et colorait. Il examinait ensuite un certain nombre de champs microscopiques et déterminait le nombre moyen de bactéries par champ (*a*), et le nombre moyen d'hématies par champ (*b*). Prenant 5 millions comme nombre moyen d'hématies par mm³, il obtenait le nombre *x* de microbes par mm³ de l'émulsion à l'aide des formules suivantes :

$$\frac{a}{b} = \frac{x}{5.000.000} \quad x = \frac{a \times 5.000.000}{b}$$

Mais le nombre des hématies est extrêmement variable et l'on a beaucoup critiqué WRIGHT d'avoir adopté cette valeur fixe de 5 millions par mm³. Pour éviter de faire un titrage à l'hématimètre pour chaque numération, pour éviter aussi des coagulations, on a proposé divers procédés, par exemple addition de sérum physiologique ou mieux de citrate de soude, permettant d'utiliser une même suspension pour des numérations successives.

DREYER (30) (1921) a employé du sang de poule très dilué.

Mais ces émulsions d'hématies sont malgré tout difficiles à conserver longtemps ; c'est pourquoi FRIES (37) (1921) a proposé de remplacer les hématies par de simples cellules de levure de bière, dont la forme est assez nette pour ne pas être confondue avec celle des microbes.

La méthode, décrite par WRIGHT, a subi de vives critiques.

Quelques auteurs dont HARRISSON (45) craignaient que des bactéries fussent enlevées de la lame pendant la coloration, mais si l'on effectue la coloration avec toutes les précautions possibles, ce risque d'erreur semble être bien faible, sinon nul.

On a reproché aussi à WRIGHT et à ses successeurs leur façon de faire l'étalement avec une lame ou une lamelle, comme pour une goutte de sang. L'étalement pouvait n'être pas homogène, les globules sanguins se déposant d'abord.

Or l'exactitude du procédé dépend surtout de la répartition égale des hématies et des microbes.

Les auteurs américains GLYNN, POWELL, REES et COX (41), dans leur étude sur le titrage des vaccins, ont en particulier comparé la méthode utilisant la cellule « compte-microbes » et la méthode de WRIGHT. De leurs recherches, ils ont conclu que la méthode qui emploie le « compte-microbes » est supérieure à la méthode de WRIGHT, la première donnant une erreur moyenne de 5 %, avec un minimum de 0,5 % et un maximum de 21 %, tandis que pour la seconde l'erreur moyenne est de 15 % avec un minimum de 1,1 % et un maximum de 54 %.

Mais il ne faut attribuer à ces chiffres qu'une importance assez relative. Les résultats montrent seulement que la méthode de WRIGHT est moins régulière que la méthode qui utilise le « compte-microbes ».

Comme on ne peut connaître *exactement* le nombre de microbes conte-

nus dans un certain volume de suspension, il s'ensuit que les travaux sur cette question n'auront jamais qu'une valeur relative. En tous cas, il peut fort bien se faire que la méthode la plus régulière soit en même temps la moins exacte. Il suffit qu'elle soit tributaire d'une erreur systématique pour qu'elle soit *régulièrement inexacte* (1).

*
**

Pour notre travail, nous avons employé la méthode de WRIGHT que nous avons cherché à perfectionner le plus possible et qui, dans l'ensemble, a présenté certains avantages pratiques.

Nous exposerons plus loin les détails de technique. Disons pourtant dès à présent que nous avons substitué, comme le fait FRIES, des cellules de levure aux hématies, ce qui nous a permis d'éviter l'étalement à la lame, et d'écarter ainsi, comme nous l'avons vu, une très forte cause d'erreur.

Les méthodes que nous venons de passer rapidement en revue (évaluation du volume ou du poids d'une masse microbienne, mesure de la perte qu'elle fait subir aux rayons lumineux qui la traversent, numération directe par étalement et coloration ou par emploi d'une cellule compte-microbes, numération indirecte relative), nous donnent l'ensemble des bactéries « mortes » et « vivantes ».

Nous allons voir maintenant les méthodes permettant d'obtenir seulement le nombre des bactéries que les anciens auteurs avaient dénommées « vivantes », et que nous pourrions appeler, en vertu de la définition donnée plus haut (page 15), « les plus vigoureuses ».

II. — MÉTHODES DONNANT LE NOMBRE DES MICROBES APPELÉS « VIVANTS » PAR LES AUTEURS

Plusieurs procédés ont été utilisés dans ce but.

Le premier, employé très fréquemment depuis le début de la bactériologie, repose sur la base suivante : on suppose qu'il est possible, par des dilutions convenables, de séparer les bactéries les unes des autres, de telle sorte que toute preuve de multiplication bactérienne (trouble d'un bouillon, apparition d'une colonie) puisse être considérée comme le témoin de l'existence d'une seule bactérie « vivante ».

Le second procédé, utilisé seulement récemment, et d'ailleurs encore à l'étude, est basé sur l'idée qu'il est possible de distinguer au microscope les bactéries mortes des bactéries vivantes.

Nous verrons plus loin les détails de ces diverses techniques.

Mais il faut faire remarquer que ces deux procédés dénombreront des bactéries de qualités différentes. Le second procédé va nous donner le nombre des bactéries vivantes dans le milieu originel, tandis que le premier ne comptera que les bactéries capables de se reproduire en « sub-

(1) C'est ce qui semble résulter des essais poursuivis dans ces tout derniers temps, au laboratoire de Bactériologie de la Faculté par M. NEIPP. Ce chercheur, comparant à son tour les deux méthodes, trouve les nombres donnés par le compte-microbes toujours plus petits. Il semble donner ainsi la preuve que la méthode de WRIGHT, modifiée selon la technique que nous donnerons plus loin, donne des résultats exacts.

cultures ». Et il est évident, comme nous l'avons déjà expliqué, qu'un microbe peut être fort capable de se multiplier dans le milieu où il est né, et ne pas l'être dans un milieu neuf où il est transporté. De plus, il est vraisemblable, comme les expériences de HEHEWERTH (50) semblent le prouver, que le nombre de microbes capables de se reproduire en sub-cultures, pourra varier avec les différents milieux de réensemencement. C'est pourquoi nous utiliserons le moins souvent possible le terme de microbes « vivants » pour le remplacer par une expression plus précise ; par exemple « microbes capables de se reproduire dans telle ou telle sub-culture ».

A. — Numération après dilution et ensemencement en milieu liquide.

PASTEUR, dès 1860, exposa le premier le principe de cette méthode, qui lui permit d'avoir une idée approchée du nombre de microbes contenus dans l'air.

KLEBS (1873), LISTER (1878) et MIQUEL (1879) perfectionnèrent ce procédé et, en 1880, MIQUEL (72) publiait des statistiques sur la teneur de l'eau et de l'air en moisissures et en bactéries.

La méthode créée par ces auteurs était basée sur deux principes :

1°) Par des dilutions et des agitations successives avec des quantités déterminées d'eau stérile, il est possible d'obtenir des suspensions bactériennes dans lesquelles les bactéries sont nettement séparées les unes des autres.

2°) Si la dilution est suffisante, on constate qu'en ensemençant des quantités égales de cette dilution dans un certain nombre de tubes de culture, il ne se produit de poussée que dans quelques-uns des tubes. Lorsque cette poussée ne se produit que dans 15 ou 20 % des tubes ensemencés, les cultures ainsi obtenues sont presque toujours des cultures pures. On peut donc admettre que chacune d'elles est due à une bactérie unique. En tenant compte de la dilution, il sera alors aisé de calculer le nombre de bactéries de l'émulsion primitive.

Ces principes, que MIQUEL a utilisés dans tous ses travaux, sont encore appliqués avec d'excellents résultats dans la technique mise au point par M. le Professeur RADAIS pour la numération du colibacille dans l'eau.

D'autres auteurs, américains surtout, MAC CRADY (66) (1915), WOLMAN et WEAVER (108) (1917), STEIN (100) (1919), GREENWOOD et YULE (43) (1917), MAC CRADY (67) (1918) ont repris les principes de MIQUEL en les présentant d'une façon différente, avec des études mathématiques approfondies et compliquées. Nous ne nous étendrons pas sur ces méthodes utilisées surtout aux Etats-Unis pour les analyses d'eau et la numération du bacille coli.

En somme, ces procédés de numération en milieu liquide ne sont plus guère employés que pour la numération du colibacille dans les eaux. Mais, remarquons avec MIQUEL que quatre ou cinq ans avant la découverte des procédés de séparation des microbes sur milieux solidifiés, ces techniques avaient permis de résoudre un certain nombre de problèmes bactériologiques, d'obtenir des cultures pures, et de pratiquer des analyses bactériologiques de l'air, du sol et des eaux.

B. — Numération après dilution et ensemencement sur milieux solidifiés.

KOCH en 1884 eut l'idée de mêler les suspensions microbiennes à des bouillons nutritifs gélatinés liquéfiés et de couler ces mélanges sur des plaques de verre flambées. Il laissait ces plaques de gélatine solidifiée à une température voisine de 24° et il assistait à l'éclosion des germes « qui ne pouvant se déplacer, sont contraints de se multiplier dans une zone très limitée et donnent ainsi naissance à des colonies que l'on peut compter à l'œil nu ou mieux à la loupe ».

Très rapidement cette méthode s'est généralisée et perfectionnée.

PETRI préconisa l'emploi des cristallisoirs emboîtés l'un dans l'autre qui portent son nom. D'autres récipients ont été proposés mais ont eu beaucoup moins de succès. Rapidement aussi certains auteurs remplacèrent la gélatine par la gélose, ce qui leur permit d'effectuer l'incubation à 37° C., température optimale pour la plupart des microbes, et d'éviter la liquéfaction de la gélatine produite par de nombreuses bactéries.

Le nombre de chercheurs qui ont utilisé cette méthode est immense ; le nombre de ceux qui l'ont étudiée avec précision est encore considérable. Nous ne pourrions, malgré l'intérêt que cela présenterait, faire ici une revue détaillée de leurs travaux. Nous ne pourrions guère que citer quelques-uns de ces auteurs et essayer de résumer les résultats de leurs recherches.

La technique de numération des bactéries sur milieux solidifiés a été étudiée par les auteurs suivants :

BÜCHNER, LONGARD et RIEDLIN (14) (1887), BRUNNER et ZAWADZKI (9) (1893), FRANZ LAFAR (62) (1893), MILLER (70) (1894), MAX MÜLLER (74) (1895), MAX NEISSER (76) (1895), HEHEWERTH (50) (1901), EIJKMAN (31) (1904), OTTO RAHN (81) (1906), J. E. LANE CLAYPON (63) (1909), H. CHICK (19) (1912), GLYNN, POWEL, REES et COX (41) (1913), PENFOLD (78) (1914), CHESNEY (18) (1916), GATES (40), COHEN et CLARK (22), CLARK et RUEHL (21) (1919), GRAHAM SMITH (99) (1921), JOHANNES ZEISZLER (111) (1922), WILSON (105) (1922).

Ces auteurs ont tour à tour modifié la méthode dans des sens très variés.

Pour compter les colonies développées sur gélatine ou sur gélose, les uns ont employé le microscope, les autres ont effectué les numérations à la loupe ou à l'œil nu ; les uns et les autres ont aussi modifié la technique même de l'ensemencement.

Beaucoup d'entre eux ont été conduits par le souci de faire la numération le plus vite possible. Il était en effet indispensable, pour l'étude bactériologique des eaux, de connaître le nombre de colonies avant que la liquéfaction de la gélatine, produite par certains microbes, fût venue arrêter l'expérience. Il fallait donc pouvoir déceler très tôt toutes les colonies, mêmes les plus petites et, nécessairement pour cela, user du microscope. Mais si l'on remplace la gélatine par la gélose, il n'y aura plus à se préoccuper de la liquéfaction possible. On pourra donc, pour éviter l'emploi du microscope, attendre que les colonies soient devenues assez grosses pour être visibles à l'œil nu ou à la loupe.

Beaucoup de ces auteurs ont également désiré éviter les grandes dilutions de la suspension microbienne à examiner, car ils craignaient d'accroître l'erreur faite dans la numération. C'est pour cela que les uns, comme BÜCHNER et ses collaborateurs (14), MÜLLER (74), NEISSER (76), ont cherché à compter, au microscope, des nombres de colonies très élevés, atteignant parfois 1 million de colonies par plaque ; et que les autres, en particulier les auteurs de langue anglaise, ont tenté d'effectuer des ensemencements définis, aussi petits que possible. Ils ont utilisé dans ce but, soit des pipettes capillaires [CLAYTON (63), CHICK (19)], soit des anses standards [HEHEWERTH (50), SMITH (99)].

Ce désir d'éviter de trop fortes dilutions avec l'ensemencement est à prendre en considération. Mais il nous faut examiner si les procédés employés pour éviter ces dilutions sont satisfaisants.

Nous croyons que l'ensemencement extrêmement large (atteignant parfois 1 million de germes) et la numération des colonies au microscope — procédés employés surtout par les auteurs allemands — sont sujets à plusieurs causes d'erreur. Il paraît très difficile, même avec les divers perfectionnements préconisés par les auteurs (fils tendus dans l'oculaire, projection dans le champ microscopique d'images graduées), de compter très exactement les colonies contenues dans un champ microscopique.

Ces colonies sont très nombreuses (100 à 200 par champ) et par cela même, elles se trouvent accolées, superposées, parfois unies ; elles sont placées dans des plans différents, ce qui nécessite des changements de la mise au point du microscope.

D'autre part, comme il est impossible de parcourir au microscope la plaque entière, les auteurs se sont contentés de compter les colonies d'un certain nombre de champs (30 ou 60 ou 90) et de multiplier le chiffre moyen obtenu par le nombre de champs microscopiques contenus dans la plaque à examiner. Sans tenir compte des difficultés techniques que comporte cette opération (mesure exacte du champ microscopique, de la surface de la boîte, définition précise des objectifs et oculaires utilisés, de la longueur du tube, etc...) il faut de plus que l'ensemencement soit d'une régularité absolue sur toute la surface de la boîte de PÉTRI. Or, il est à peu près impossible d'obtenir un résultat parfait, car il est très difficile de mélanger de façon tout à fait homogène l'émulsion bactérienne et la gélose fondue très visqueuse. Il faudrait aussi que le fond des boîtes de PÉTRI soit rigoureusement plat et que les bords des boîtes s'élèvent strictement à angles droits. Toutes ces conditions sont bien difficiles à réunir. Et il nous semble que la méthode proposée par ces auteurs n'est pas aussi exacte qu'elle le paraît.

Aux auteurs de langue anglaise qui ensemencent au contraire des quantités très faibles, à l'aide de pipettes capillaires jaugées en gouttes et d'anses standards, nous pourrions répéter les objections que nous avons faites déjà au sujet des anses de platine jaugées employées dans la méthode de KLEIN (modification de la tension superficielle, de la viscosité).

Ainsi ces auteurs ont mis tout en œuvre pour éviter des dilutions comportant à leur avis de fortes causes d'erreur. Nous avons déjà vu, par contre, que MIQUEL par exemple, et bien d'autres chercheurs, ont employé des dilutions successives pour leurs numérations, et leurs résultats valent certainement ceux des auteurs précédents. Il est vrai qu'ils analysaient

surtout des liquides (eaux potables ou non potables) dans lesquels la teneur en microbes était plus faible que celle des suspensions microbiennes que nous analysons. Mais nous croyons qu'avec des précautions spéciales, nous pouvons effectuer de fortes dilutions sans risques d'erreurs très grands.

Une première critique dont est passible la méthode des dilutions est qu'il est difficile de répartir également les bactéries dans toute la masse du liquide. On peut craindre qu'il subsiste des amas microbiens, plus ou moins importants qui, après ensemencement, donneront naissance à une seule colonie. Cette objection s'applique non pas seulement à la méthode de dilution, mais à la méthode même de numération par culture, soit en milieu solide, soit en milieu liquide, et les méthodes employées par les auteurs étrangers sont également passibles de cette critique.

Pour diminuer cette cause d'erreur, il faut essayer de briser le plus possible les amas microbiens. On effectuera les premières dilutions non pas dans des liquides visqueux gélifiés ou gélatinés fondus (comme le faisaient les auteurs que nous avons cités), mais dans des liquides fluides (eau, eau salée, bouillon) ; on procédera chaque fois à des transports de volumes assez grands pour qu'ils puissent être mesurés avec précision à l'aide de pipettes graduées, et à des agitations vives, efficaces et prolongées avec des billes de verre.

D'autre part on peut craindre, avec certains auteurs, que les liquides de dilution n'exercent une action nocive sur les bactéries. Mais WILSON (105) (1922) a montré que l'eau distillée ou le sérum physiologique n'agissaient qu'après un temps assez long. Pour éviter toute action nuisible, il suffira que le temps de contact des bactéries et du liquide de dilution soit aussi court que possible.

En conclusion, nous croyons qu'il est possible, en travaillant de façon soigneuse et rapide, d'effectuer des dilutions telles que le nombre de bactéries par unité de volume ne dépasse pas *quelques centaines*. Après ensemencement d'une unité de volume sur plaque de gélose, et incubation à 37° C., il sera facile de compter à la loupe ou à l'œil nu, *toutes* les colonies ayant poussé. Nous évitons ainsi l'erreur des numérations sur plaques de gélatine (température d'incubation trop basse, liquéfaction possible) et celle des numérations sur gélose qui, par suite de la trop grande abondance des colonies, ne peuvent tenir compte que d'une partie de la surface de la boîte de PÉTRI.

Nous exposerons plus loin la technique que nous avons employée, en tenant compte de toutes les remarques faites ci-dessus.

C. — Numération microscopique des bactéries vivantes.

D'après leur aspect morphologique ;

D'après leur réaction spéciale vis-à-vis de certaines matières colorantes.

1°) HANS HECKSCHER (49) (1921) proposa une numération des bactéries vivantes basée sur leur aspect morphologique. Il a étudié des bacilles divers et, selon lui, « chaque germe, capable de proliférer, se développe en un long bâtonnet, dont la forme contraste fortement avec celle des

bacilles incapables de prolifération et qui ne se transforment pas. A l'aide de numérations différentielles faites au microscope, il est donc possible de connaître quel est le nombre de bacilles ensemencés qui proliféreront dans les conditions données de culture. »

Ce mode de numération est fort intéressant en théorie, mais semble peu susceptible d'applications pratiques. L'auteur lui-même constate qu'il est difficile de donner des précisions sur le moment où il convient de faire l'examen.

2°) Le second procédé utilisé pour la numération microscopique des microbes vivants est basé sur le fait qu'il est possible de distinguer, après coloration, les bactéries mortes et les bactéries vivantes, celles-ci ne prenant pas le colorant que celles-là fixent au contraire énergiquement.

BURGESS (15) (1920), FRASER (35) (1921), FULMER (38) (1921) et d'autres avaient déjà appliqué ce procédé à l'étude des levures. HENRICI (52) (1923) l'appliqua le premier à la numération différentielle des microbes vivants et des microbes morts.

Les travaux de HENRICI mériteraient d'être étudiés en détail, nous en reparlerons d'ailleurs ultérieurement. Mais sa méthode de numération, trop récente, n'a pas encore fait ses preuves et, dans certains cas, d'après l'auteur lui-même, elle ne donne pas des résultats indiscutables.

III. — MÉTHODES BASÉES SUR L'ACTIVITÉ BIOCHIMIQUE DES BACTÉRIES

Les méthodes basées sur le dosage des produits de la vie microbienne ou sur la disparition progressive d'un aliment sont relativement peu nombreuses. Elles se sont adressées particulièrement à la fermentation alcoolique et à la fermentation lactique.

F. REGNARD (83) (1882), BIERNACKI (6) (1891), W. HESSE (57) (1893), H. SCHULTZ (90) (1907), H. LUHRIG et A. SARTORI (65) (1908), SLATOR (96) (1913), ABDERHALDEN (1) (1915) ont étudié la fermentation alcoolique et la production de gaz par différents microbes.

NAEGELI et SCHWENDENER (75) (1877), puis CHARLES RICHTER (86) et ses collaborateurs CHASSEVANT, H. CARDOT (16), et E. BACHRACH (4) (1914), et d'autres auteurs, au moyen de titrages de l'acide lactique produit, étudièrent quantitativement la poussée normale des bacilles lactiques et leur poussée en présence de divers antiseptiques. MICHAËLIS et MARCORA (69) (1912) ont utilisé les variations du pH dans leur étude sur la poussée du coli-bacille.

On peut encore citer diverses techniques utilisées dans la bactériologie du sol pour la détermination de l'ammonification, de la nitrification et de la fixation d'azote.

Ces procédés ne sont malheureusement applicables qu'à un très petit nombre de microorganismes. Nos connaissances de biochimie microbienne sont actuellement encore trop insuffisantes pour nous permettre de généraliser. En particulier, nous ne pouvons encore appliquer ces méthodes à la plupart des microbes saprophytes ou pathogènes habituellement étudiés dans les laboratoires. D'autre part, comme l'a montré

R. DAVID (25 bis), du fait de la mise en liberté des ferments, l'action chimique exercée se continue quelquefois pendant un assez long temps après l'arrêt de la multiplication.

IV. — MÉTHODES QUE NOUS AVONS UTILISÉES POUR L'ÉTUDE DE LA NUMÉRATION MICROBIENNE

Nous venons de passer rapidement en revue les diverses méthodes employées pour la numération des bactéries.

Nous exposerons plus loin le détail des techniques que nous avons choisies pour effectuer nos recherches et qui sont basées en très grande partie sur les travaux des auteurs que nous avons cités.

Nous rappellerons simplement ici que notre but a été de suivre, par des examens répétés, aussi fréquents que possible, l'évolution d'une culture microbienne (*B. pyocyaneus*) en milieu liquide.

Nous avons pratiqué deux sortes de numération :

1°) une numération microscopique à l'aide d'une méthode basée sur les principes de la méthode WRIGHT ;

2°) une numération sur plaques de gélose.

CHAPITRE II

ÉTUDES NUMÉRIQUES DE LA POUSSÉE MICROBIENNE

Dans une première partie nous exposerons successivement, par ordre chronologique, les résultats trouvés par les auteurs qui se sont occupés de cette question. Dans une seconde partie, nous appuyant sur ces données, les comparant et les réunissant, nous montrerons comment, à l'heure actuelle, on peut concevoir l'évolution de la poussée microbienne.

EXPOSÉ DES TRAVAUX EFFECTUÉS POUR L'ÉTUDE DE LA POUSSÉE MICROBIENNE

Les premiers essais furent effectués par des auteurs qui voulaient étudier la flore bactérienne des eaux.

Dès 1885, CRAMER (24) étudia la poussée des microbes d'un échantillon d'eau du lac de Zurich conservé pendant 70 jours.

En 1886, LEONE, de Munich, étudia la flore microbienne d'une eau courante, après l'avoir mise en flacon, sans addition de matière étrangère. Il constata que cette eau qui renfermait 5 microbes par cm^3 le premier jour, en contenait 100 le deuxième jour, 10.500 le troisième, 67.000 le quatrième et 325.000 le cinquième, et atteignait le sixième jour le chiffre maximum de 500.000.

En 1887 et les années suivantes, MIQUEL (71), dans les mêmes conditions (mise en bouteille et température de 29 à 30°), étudia l'évolution bactérienne des eaux de la Vanne et de la Dhuis. Il constata une multiplication microbienne rapide, le nombre des microbes qui était de quelques dizaines au moment du prélèvement atteignant en quelques jours des chiffres voisins de 1 ou plusieurs millions. Il montra que, dans la suite, les bactéries se détruisaient, mais que cette destruction était bien plus lente que la multiplication préliminaire.

FÜLLER (1895), étudiant un échantillon d'eau d'étang, constata au début une chute du nombre, suivie d'un accroissement rapide. Ce résultat fut confirmé par WHIPPLE en 1901. FOKKER (1890) l'avait déjà signalé dans l'étude numérique des bactéries du lait.

Mais ces essais n'étaient pas faits dans le but précis d'étudier la poussée microbienne. Le milieu (eau ordinaire) n'était que peu nutritif, la race des microbes n'était pas définie, la température était le plus souvent variable.

Les travaux que nous allons maintenant examiner ont été faits dans

le but précis d'étudier la multiplication d'organismes ensemencés dans des milieux bien définis et placés dans des conditions parfaitement connues.

L'honneur d'avoir abordé cette question avec toutes les garanties désirables revient à BÜCHNER et à ses élèves.

H. BÜCHNER, K. LONGARD et G. RIEDLIN (14) (1887) cherchant à se rendre compte de la rapidité de propagation d'une infection, étudièrent, par numération des colonies sur plaques de gélatine, la multiplication du vibrion cholérique en bouillon nutritif. Pour étudier la multiplication d'une bactérie, il fallait à leur avis :

- 1°) utiliser un milieu de culture aussi favorable que possible ;
- 2°) choisir une température favorable : 37° ;
- 3°) choisir une culture souche, non seulement pure, mais aussi vigoureuse que possible ;
- 4°) déterminer avec précision le nombre de microbes ensemencés, nombre qui doit être faible (quelques centaines par centimètre cube) pour que le milieu nutritif reste aussi longtemps que possible favorable à la multiplication des microbes ;
- 5°) déterminer avec précision le nombre de microbes existant à la fin de l'expérience ;
- 6°) connaître exactement la durée de l'expérience ; cette durée était courte (2 à 5 heures pour éviter une accumulation nuisible des produits du métabolisme microbien).

Se basant sur le fait admis dès cette époque, qu'une cellule microbienne se multipliait par scissiparité, c'est-à-dire se partageait en deux cellules égales, les auteurs appliquèrent à l'étude numérique du phénomène, le raisonnement suivant qui est resté à la base de toutes les études sur cette question.

Connaissant le nombre de microbes au début et à la fin d'une expérience, il est possible de calculer le nombre de bipartitions produites dans ce temps donné et par conséquent la durée d'une bipartition, c'est-à-dire le temps nécessaire à la formation d'une génération.

Calculons par exemple le nombre de bipartitions produites pendant une période de 5 heures. Soit a le nombre de microbes au début et b le nombre de microbes à la fin de cette période. Soit x le nombre de bipartitions effectuées.

Décomposons le phénomène :

Après 1 bipartition, nous avons $a \times 2$ microbes.

Après 2 bipartitions, nous avons $a \times 2 \times 2$ microbes.

Après 3 bipartitions, nous avons $a \times 2 \times 2 \times 2$ microbes.

Après x partitions, nous avons $a \times 2^x$ microbes.

Nous savons par l'expérience qu'après x bipartitions, nous avons b microbes ; nous pouvons donc écrire :

$$a \times 2^x = b$$

soit
$$2^x = \frac{b}{a}$$

ou :
$$x = \frac{\log b - \log a}{\log 2}$$

Ces x bipartitions se sont produites en 5 heures ou 300 minutes ; la durée moyenne d'une bipartition ou temps de génération pendant la période considérée est donc, en minutes :

$$y = \frac{300}{x}$$

Ce raisonnement appliqué par les auteurs allemands à la recherche du temps de génération du vibrion cholérique, leur donna des chiffres variant de 20 à 40 minutes suivant les expériences. Ils attribuèrent les variations au fait que les souchesensemencées étaient dissemblables.

En 1895, MAX MÜLLER (74) eut l'idée de rechercher l'influence des températures fébriles réalisées expérimentalement « in vitro » sur la vitesse de multiplication des bactéries pathogènes. Il étudia par la méthode des plaques de gélose, la multiplication du bacille typhique en bouillon nutritif, à 40° C. et à 37° C.

Au lieu de se borner à compter les microbes seulement au début et à la fin de l'expérience, l'auteur fit des numérations plus fréquentes, à peu près toutes les 3 heures, la durée totale de l'expérience étant de 12 heures environ.

Il remarqua alors ce fait inattendu que dans les 2 ou 3 premières heures il n'y avait aucune multiplication microbienne. Il crut d'abord à une erreur d'expérience, puis il attribua le phénomène à une sorte d'altération subie par le microbe dans le milieu souche. Pour vaincre les effets de ce préjudice et reprendre une multiplication normale, il fallait aux bactéries un temps de repos nécessaire. Afin de vérifier cette supposition, l'auteur opéra avec des cultures d'âges divers, de préférence très jeunes. Il démontra que les temps de génération étaient nettement plus courts pour des cultures très récentes (2 h. 1/2, 2 h. 3/4, 3 h.) repiquées sur un bouillon frais que pour des cultures relativement âgées (14 h., 16 h. et plus)ensemencées dans les mêmes conditions ; et que la durée de la période de latence diminuait quand on effectuait les essais à partir de cultures très jeunes.

Il montra aussi que les temps de génération trouvés par BÜCHNER et ses collaborateurs variaient fortement entre eux parce que les périodes de poussée n'étaient pas égales, le temps de latence influait diversement dans chaque expérience.

Quoi qu'il en soit, d'après MÜLLER, quand on effectue des repiquages en bouillon à partir de cultures vieilles d'un ou deux jours, on constate dans la poussée microbienne trois stades différents :

1°) Une période de non propagation qui dépend de l'âge de la culture souche et qui dure au maximum 3 à 4 heures ;

2°) Une période pendant laquelle les générations se succèdent avec une rapidité assez uniforme ;

3°) Une période où la propagation va de plus en plus lentement pour finalement s'arrêter.

Enfin MÜLLER, revenant au problème qu'il s'était posé au début de ses recherches, constata que les températures « fébriles » n'étaient pas capables d'arrêter la poussée du bacille typhique, mais qu'il fallait, pour obtenir ce résultat, atteindre la température de 44°5 C.

Ainsi les travaux de BÜCHNER et de ses élèves, de MÜLLER, quoique

effectués dans un but particulier, ont apporté déjà des notions générales essentielles : temps de latence, temps de génération et moyen de le calculer ; période de multiplication uniforme, période de ralentissement.

Les travaux suivants ne feront qu'apporter des détails supplémentaires à ces données primordiales.

GOTSCHLICH et WEIGANG (42) (1895) étudièrent la poussée du vibrion cholérique ; la culture était faite non pas en bouillon, mais sur bouillon gélosé incliné.

Parmi les résultats trouvés par ces auteurs, citons les suivants, qui sont en partie devenus classiques :

1°) Les organismes d'une culture maintenue plusieurs jours à 37° se détruisent rapidement.

2°) Si on place à une température basse une culture de 20 heures qui s'est développée à 37°, la diminution du nombre de microbes capables de se reproduire sur gélatine est bien plus lente.

3°) Le nombre de bacilles, comptés au moment du maximum de poussée, est, dans de larges limites, indépendant du nombre des microbes ensemencés.

4°) Le nombre maximum de microbes, dans des cultures effectuées dans les mêmes conditions, mais provenant de souches différentes, présente des oscillations assez importantes.

5°) Dans les conditions de l'expérience (gélose inclinée maintenue à 37°) le maximum de poussée semble être atteint vers la 20^e heure.

6°) Si la culture est placée après l'ensemencement, à une température relativement basse, 22° par exemple, le maximum de la poussée n'est atteint qu'au 2^e jour et le chiffre atteint est bien plus grand.

7°) La virulence d'une culture donnée est la somme des virulences des individus séparés et dépend donc uniquement du nombre des individus vivants.

En 1901, HEHEWERTH (50) suivit la multiplication du vibrion cholérique, du bacille coli et du bacille typhique sur gélose et en bouillon, simultanément par la méthode de KLEIN pour la numération directe de la totalité des germes et par la méthode de NEISSER pour la numération des microbes capables de se reproduire sur gélose.

Il obtint les résultats suivants :

Dans une culture sur gélose inclinée, largement ensemencée et mise à l'étuve à 37°, si l'on compare à des heures diverses le nombre total des bactéries, et le nombre des bactéries vivantes, on constate que le premier nombre est toujours, même dans une culture jeune, plus grand que le second. Puis, au fur et à mesure du vieillissement, la différence s'accroît pour devenir, après quelques jours d'étuve, tout à fait considérable, le nombre des bactéries vivantes s'abaissant rapidement après avoir atteint un chiffre maximum entre la 10^e et la 25^e heure.

Sur bouillon, les résultats obtenus sont semblables. Toutefois, l'auteur admet qu'il y a peu de différence, pour les premières heures de la poussée, entre les chiffres qui expriment le nombre total de bactéries et ceux qui traduisent le nombre des bactéries capables de se reproduire sur gélose.

Il constate d'autre part que la diminution de ce dernier nombre est moins rapide dans une culture en bouillon que dans une culture sur gélose.

Enfin HEHEWERTH mit en évidence le temps de latence dans les premières heures de la culture et confirma ainsi les travaux de MÜLLER. Mais forcé pour cela de pratiquer desensemencements faibles, il ne put employer que la méthode des plaques de NEISSER. Il montra que la latence varie avec l'espèce microbienne, avec l'âge de la culture employée et la température d'incubation ; qu'elle est plus prolongée dans le cas de cultures vieilles et pour des températures plus basses ; plus courte quand les repiquages sont effectués sur des milieux auxquels les microbes sont déjà accoutumés.

Il constata d'autre part que, en bouillon à 37°, le bacille coli se développait plus vite (temps de génération minimum 23 minutes) que le bacille typhique (33 minutes), avec maximum de développement pour le premier à la 8^e heure, et pour le second à la 11^e heure.

Il montra aussi que l'ensemencement dans un milieu moins favorable (eau peptonée salée) ralentit la poussée (temps de génération minimum : 32 minutes pour *B. coli* et 41 minutes pour *B. typhique*).

EIJKMAN (31) (1904) essaya, le premier, d'expliquer pour quelle raison la poussée microbienne, après s'être poursuivie un certain nombre d'heures, s'arrêtait dans les milieux de culture.

Deux hypothèses s'offrirent à son esprit : il pouvait s'agir soit d'un arrêt par épuisement du milieu nutritif, soit d'un arrêt par accumulation de substances provenant du développement microbien.

Il entreprit, pour étudier cette question, toute une série de recherches d'une ingéniosité remarquable, que nous ne pouvons malheureusement étudier ici en détails.

D'après cet auteur, l'arrêt de développement d'une culture serait dû, non pas à un manque d'aliments, mais à la présence dans le milieu de substances inhibitrices, *thermolabiles*, non *filtrables*, mais pourtant *diffusibles*.

Signalons qu'il étudia aussi, dans un ordre d'idées légèrement différent, l'action empêchante qu'exerce une espèce sur une autre et qu'il fut sans doute le premier à concevoir, pour différencier et isoler les organismes, la préparation de milieux préalablement cultivés et ainsi rendus inaptes à la poussée des microbes responsables de ces premières cultures.

En 1906, OTTO RAHN (81) chercha à connaître d'une part la cause de la latence, et d'autre part la cause de l'arrêt de la croissance après la multiplication maxima. Il étudia le développement de *B. liquefaciens fluorescens* en bouillon peptoné salé et utilisa pour la numération des microbes la méthode d'ensemencement sur plaques de gélose.

Il montra d'abord, comme MÜLLER (74) et HEHEWERTH (50) l'avaient déjà signalé, que la période de latence est d'autant plus marquée que les bactéries ensemencées sont plus vieilles et que la température est plus basse. Il trouva par contre que cette phase diminue par ensemencement d'un grand nombre de germes.

Pour expliquer la période de latence il proposa plusieurs hypothèses : soit formation préalable par les bactéries ensemencées de diastases nécessaires à l'assimilation de la substance nutritive ; ou au contraire, de substances toxiques capables, en petites quantités, d'accélérer la poussée

microbienne; soit enfin, action directe des bactéries agissant elles-mêmes sur la phase de latence par leur apport d'endoenzymes.

Les expériences qu'il effectua lui-même pour vérifier ces hypothèses montrèrent qu'elles étaient inexactes.

Il conclut cependant que la phase de latence n'est vaincue qu'après apport, puis production suffisante par les bactéries elles-mêmes, d'une substance favorable à la poussée microbienne; ceci explique que la latence est d'autant plus courte que l'ensemencement est plus grand.

D'autre part, OTTO RAHN étudiant le mécanisme de l'arrêt de la croissance après multiplication maxima, arriva aux mêmes conclusions qu'ENKMAN.

En 1908 parut un travail très important de BARBER (5). Cet auteur étudia la poussée de *B. coli* en bouillon peptoné à l'aide de techniques spéciales très précises.

Il partait d'une *bactérie unique* qu'il ensemait à l'aide de pipettes capillaires, dans une « goutte pendante » de bouillon, en lame-cellule, et il suivait la multiplication directement au microscope. Il pouvait ainsi étudier la poussée microbienne pendant un nombre considérable de générations, et noter en même temps la mobilité des éléments bactériens et leurs variations de grandeur. Il mit au point trois sortes de techniques se complétant entre elles (étude prolongée dans une même goutte, repiquages successifs dans des gouttes différentes, repiquage dans une masse plus grande de bouillon), l'ensemencement étant toujours fait par bactérie unique.

Il fit les constatations suivantes : dans les conditions où il opérait (transport d'une bactérie très jeune de 2^e ou 3^e génération, à partir d'un bouillon dans un autre bouillon de même composition, numération microscopique directe) il n'y avait pas de phase de latence, pas plus pour *B. coli* que pour *B. typhi* ou pour *B. subtilis*.

Les bactéries se multiplient dans le nouveau milieu d'emblée, en progression géométrique (2-4-8-16-32-64, etc.), le temps de génération minimum restant constant.

On ne peut donc admettre, avec OTTO RAHN (81), la nécessité de la formation préliminaire d'une substance spécifique, ou bien si cette substance est nécessaire, il faudrait conclure que la quantité transportée par une bactérie est suffisante.

Pour expliquer les résultats trouvés par les autres auteurs, BARBER admit que les bactéries relativement petites provenant de cultures âgées se multipliaient plus lentement que les bactéries jeunes, plus longues, qui présentent, dès leur ensemencement, le maximum de poussée. Le délai initial (temps de latence) serait dû non pas à un arrêt de croissance, mais au temps nécessaire pour que les éléments âgés de forme courte aient atteint une taille suffisante pour pouvoir se séparer en deux nouvelles unités.

Dans ses expériences, BARBER faisant varier les températures fit des remarques intéressantes sur la mobilité des bactéries, sur leur morphologie, et surtout sur le temps de génération qui, pratiquement infini au-dessous de 10°, diminue rapidement quand la température s'élève, atteint un minimum vers 37°, se maintient sensiblement à la même valeur jusqu'à 46°, puis augmente rapidement pour devenir infiniment grand à 50°.

Notons enfin que dans les expériences de BARBER, la constitution des bouillons de culture utilisés ne paraît pas avoir grande importance.

En 1909, JANET E. LANE CLAYPON (63) étudia la multiplication en bouillon des bacilles coli, typhique et dysentérique par numération des colonies sur plaques de gélose. Le nombre de germes ensemencés était relativement petit : 200 à 500 microbes par centimètre cube, l'ensemencement était fait avec des bactéries relativement âgées (20 heures).

L'auteur distingua, lui aussi, quatre phases dans la multiplication :

1°) Une période de poussée nulle ou très lente se prolongeant pour *B. coli* et *B. enteriditis* de 1 à 6 heures selon que la température s'abaisse de 42° à 20°, et se montrant un peu plus longue pour le *bacille typhique*.

2°) Une période de poussée régulière, ou de multiplication géométrique d'autant plus courte que les ensemencements sont plus grands et les températures plus élevées.

Cette période dure, pour *B. coli* et *B. enteriditis* : 7 h. 1/2 à la température de 37°, 8 h. 1/2 à 30°, 15 h. à 25°, et 24 h. à 20°. Le bacille typhique pousse plus lentement, mais l'accroissement logarithmique dure plus longtemps.

3°) Une période pendant laquelle la rapidité de croissance se ralentit graduellement.

4°) Une période pendant laquelle le nombre des bactéries reste constant pendant quelques jours (2 à 4 jours selon la température), après quoi il commence à décroître rapidement..

L'auteur étudia, d'autre part, l'influence de la température sur la durée de germination et retrouva les mêmes résultats que BARBER : diminution du temps de génération de 20° à 42°, puis augmentation ; au-dessus de 50°, arrêt de la multiplication et diminution de nombre.

Entre 20° et 35°, l'effet de la température sur la croissance des deux organismes est régulier : chaque augmentation d'un degré produit une même augmentation de la valeur de croissance. Au-dessus de 35°, l'action de la température est moins nette, résultat déjà trouvé par BARBER.

MYER COPLANS (23), en 1910, publia ses recherches sur la phase de latence.

Il effectua ses expériences sur le colibacille, et fit les numérations par la méthode des plaques.

Les essais faits sur deux milieux différents : eau peptonée salée et bouillon dulcité avec des microbes provenant de cultures âgées de 14 h. 1/2 montrèrent que la phase de latence existait dans l'un et l'autre cas, mais qu'elle était plus nette avec le bouillon dulcité, et qu'il y avait même, aussitôt après ensemencement dans ce milieu, baisse du nombre de bactéries.

De ces faits, COPLANS conclut que l'ensemencement dans un milieu différent du milieu de conservation déterminait une diminution de la vitalité des bactéries, et que cette « injure » faite aux éléments microbiens avait pour effet de créer la période de latence.

Pourtant le fait que la phase de multiplication ralentie existe même pour des organismes repiqués en série sur un même milieu, conduisit l'auteur à admettre la nécessité d'une sécrétion, par les bactéries, de

substances telles qu'elles adaptent le milieu à être plus vite absorbé par le protoplasme de l'organisme.

L'auteur constata, d'autre part, que la latence devenait plus grande quand on utilisait, pour l'ensemencement, des cultures mères vieilles, ou des cultures mères portées préalablement à basse température, ou ayant été mises en présence de faibles quantités d'antiseptiques comme le borax.

En 1911, MAC KENDRICK et PAÏ (68) (d'après SMITH) utilisèrent des souches de *B. coli* fort jeunes (1 à 3 heures) et constatèrent que l'on pouvait ainsi éliminer la latence. Ils attribuèrent l'arrêt de la multiplication, après atteinte du chiffre maximum, à l'usure des aliments nécessaires à la bactérie pour se reproduire. « Les organismes se multiplient dans une culture par simple conversion de l'aliment disponible en d'autres organismes et le degré de la multiplication est proportionnel à la concentration de la substance nutritive. »

Miss H. CHICK (19) (1912) étudia les propriétés bactéricides du sérum sanguin et rechercha l'influence des élévations de température telles que celles qui se produisent dans les maladies fébriles.

Les bactéries, bacille coli ou bacille typhique, provenaient d'une culture de 24 h. en bouillon à 37°. Elles étaient ensemencées, à raison d'un million environ par centimètre cube, dans le sérum sanguin de lapin pour *B. coli*, ou le sérum sanguin de chèvre, pour *B. typhi*; ces cultures étaient placées dans des thermostats réglés à 20°, 30°, 40°. Les numérations étaient faites à intervalles réguliers, par la méthode des cultures sur plaque.

L'auteur observa :

- 1°) une période de repos, avec parfois diminution du nombre ;
- 2°) une période de multiplication géométrique ;
- 3°) une dernière phase dans laquelle se faisait sentir l'action bactéricide du sérum.

Ces périodes étaient d'autant plus courtes que la température était plus élevée. Le temps de génération minimum était de 41 minutes, c'est-à-dire plus long qu'en bouillon ordinaire.

Miss H. CHICK constata que dans la 3^e phase, l'action destructrice suivait une loi logarithmique, analogue, mais en sens inverse, à celle que suivait la poussée logarithmique dans la 2^e phase. L'action bactéricide du sérum était donc analogue à celle des antiseptiques, seulement un peu moins sensible à l'action de la température.

De ses expériences, l'auteur conclut aussi, comme d'autres l'avaient fait déjà antérieurement, qu'il est impossible d'attribuer à la fièvre une action nette d'arrêt sur la poussée des microbes dans l'organisme animal.

En 1914, PENFOLD (78) publia un remarquable travail fort documenté sur la nature de la phase de latence. Il reprit tous les essais effectués par ses prédécesseurs et discuta, en se basant sur leurs résultats mêmes, les conclusions auxquelles ils étaient arrivés. Il effectua en outre toute une série de recherches personnelles en faisant varier tous les facteurs capables d'agir sur la phase de latence, puis il chercha à son tour à donner une explication plausible de l'existence de cette période.

Dans la première partie de son travail, PENFOLD définit les conditions dans lesquelles il fallait se placer pour étudier exactement la phase de

latence : grand nombre d'expériences, uniformité des milieux de culture, constance de la température, et, pour éviter la variation des micro-organismes, essais autant que possible simultanés.

Il étudia la poussée du bacille coli à 37° en eau peptonée et suivit la multiplication sur plaques de géloses, avec comme souche une culture en eau peptonée de 20 heures.

Il constata une phase de latence de 3 heures durant laquelle le temps de génération, d'abord très grand, s'abaissait peu à peu ; puis une phase de multiplication géométrique se prolongeant aussi 3 heures, pendant laquelle le temps de génération, 18 à 20 minutes, restait constant. Enfin, à partir de la 6^e heure, apparut une période durant laquelle le temps de génération augmentait de plus en plus, jusqu'à devenir infini au moment où était atteint le nombre maximum de germes.

S'attachant spécialement à la phase de latence, PENFOLD démontra que, contrairement aux conclusions de RAHN, dans le cas de larges ensemencements (au maximum 200.000 germes par centimètre cube) la grandeur de ceux-ci a peu d'effet sur la latence. Cependant, pour de petits ensemencements (100 à 10.000 germes par cm³), la latence est plus marquée pour les ensemencements les plus faibles.

D'autre part, il montra que si la croissance à son stade le plus rapide est interrompue par une courte action du froid, il se produit par rétablissement de la température une nouvelle croissance sans phase de latence. Mais si l'action du froid est plus prolongée (par exemple 24 heures), il apparaît une nouvelle phase de latence à la reprise de la poussée.

Il aborda ensuite l'étude de la latence en fonction de l'âge de la culture-mère. Certains auteurs, BARBER (5), MAC KENDRICK et PAI (68) avaient constaté que, pour des cultures repiquées pendant la phase de poussée logarithmique, le temps de latence n'existait plus. Ceci avait été, soit laissé dans l'ombre, soit nié par d'autres auteurs, tels que RAHN (81) ou MYER COPLANS (23). PENFOLD repiqua une culture vers la 5^e heure, en pleine période de multiplication géométrique : les temps de génération pour les 3 premières heures furent : 20, 22 et 19 minutes, il n'y avait donc pas de latence. Les résultats trouvés par RAHN et COPLANS étaient vraisemblablement dus au fait que les souches employées par ces auteurs avaient dépassé la période de croissance maxima.

Conformément aux expériences de LANE-CLAYPON (63) et H. CHICK (19), il trouva que la latence est plus prolongée quand la température est plus basse ; et conformément aux expériences de MÜLLER (74), RAHN (81) et COPLANS (23), il montra que la latence est plus longue quand les cultures mères sont plus âgées, sans que toutefois ce prolongement soit proportionnel à la vieillesse. Ainsi, par exemple, la latence est la même pour une culture de 12 jours que pour une culture de 4 jours.

Comme COPLANS, il montra que la latence persiste quand les ensemencements successifs sont faits dans le même milieu ; et que cette latence est variable suivant la constitution de ce milieu. Ainsi, toutes les autres conditions étant les mêmes, la latence est plus longue pour le colibacille repiqué d'eau peptonée dulcifiée en eau peptonée dulcifiée, que pour le même microbe repiqué d'eau peptonée simple en eau peptonée simple.

Par des expériences appropriées, PENFOLD essaya de vérifier l'hypothèse d'OTTO RAHN qui attribuait la latence à un manque de substances

secrétées par les bactéries, et celle d'EJIKMAN d'après laquelle la phase de latence serait due à des substances inhibitrices entraînées par les bactéries. Mais ces expériences ne prouvèrent pas l'exactitude des hypothèses de RAHN (81) et d'EJIKMAN (31).

Il constata d'ailleurs qu'après avoir centrifugé une culture de bacille coli, les quelques bactéries restant dans le liquide surnageant se multipliaient rapidement (ce qui indiquait l'absence de substances inhibitrices) mais présentaient toutefois auparavant une phase de latence (ce qui indiquait l'absence de substances accélérantes).

Enfin, après avoir soigneusement étudié les travaux de ses prédécesseurs, et exposé ses travaux et recherches personnels, PENFOLD proposa, pour expliquer la latence, deux hypothèses nouvelles qui lui semblaient particulièrement convenables :

1°) Il peut exister dans les bactéries ensemencées des individus microbiens ayant des possibilités différentes de croissance. Durant la poussée, il se ferait une sorte de sélection d'une souche poussant rapidement.

2°) On peut aussi penser que certains des constituants du protoplasme bactérien sont synthétisés par échelons, peut-être grâce aux actions successives d'un certain nombre d'enzymes. Dans ce cas, la croissance rapide coïnciderait avec la concentration optima dans la bactérie, de ces substances intermédiaires.

Ces hypothèses qui, d'après PENFOLD, sont en accord avec beaucoup de faits connus, ne sont pourtant pas absolument convaincantes, malgré le soin avec lequel il a étudié les conditions de production de la latence, et l'intérêt de ses résultats expérimentaux.

De plus, les chiffres trouvés par PENFOLD lui ont servi, avec la collaboration de LEDINGHAM (64), à étudier la phase de latence du point de vue mathématique.

En 1916, ALAN M. CHESNEY (18) étudia, par culture sur plaque de gélose glucosée, la poussée en bouillon du *pneumocoque*, du *colibacille*, du *B. prodigiosus* et du *B. fluorescens liquefaciens*.

L'auteur arriva aux mêmes conclusions que les auteurs précédents : phase de latence se prolongeant de 3 à 4 heures, phase de multiplication géométrique allant jusqu'à la 7^e heure, phase de multiplication décroissante allant jusqu'à la 10^e heure et plateau précédant la période de déclin. Il montra à son tour qu'une culture repiquée en période de multiplication maxima dans un milieu semblable se reproduit sans phase de latence.

D'autre part, il remarqua que les « substances » responsables de l'arrêt de la poussée microbienne exercent une action inhibitrice très marquée au moment du maximum de croissance, et que cette action inhibitrice diminue quand la culture vieillit.

Revenant aux théories des premiers auteurs, ALAN M. CHESNEY conclut de ces faits que la latence est due à une altération de la cellule bactérienne produite par une action, directe ou indirecte, des produits mêmes du métabolisme bactérien. Cette altération amène soit la mort de la cellule, soit l'arrêt temporaire de croissance. Il fait remarquer qu'il faut tenir grand compte de cette notion d'altération microbienne, si l'on veut comprendre les variations de virulence des cultures. De même il rappelle que ces données sont fort importantes quand on veut étudier l'activité des agents bactéricides. Ainsi il souligne l'expérience de Miss H. CHICK (19)

d'après laquelle les individus d'une culture âgée de 3 heures sont nettement plus résistants aux antiseptiques que ceux qui proviennent de la même souche mais sont âgés de 18 heures (1).

BUCHANAN (10) (1918) reprenant les travaux que nous venons de citer, montra que la phase de latence peut être divisée en une première phase initiale stationnaire et une deuxième présentant une accélération positive de croissance. Nous aurons l'occasion, plus loin, de citer cet auteur qui a eu le mérite d'exposer clairement la plupart des travaux concernant la multiplication microbienne et d'apporter quelques conceptions nouvelles.

En 1919, BARNETT COHEN et MANSFIELD CLARK (22) étudièrent, par des numérations répétées, la poussée de certaines bactéries dans des milieux à pH différents. Ils recherchèrent surtout l'influence des modifications des pH sur la phase de multiplication logarithmique qui dure de la 5^e à la 10^e heure.

Les résultats fort intéressants trouvés par ces auteurs seront examinés plus longuement dans un autre travail. Rappelons ici simplement que pour un microbe donné, *B. coli* par exemple, il existe une zone de pH assez large d'ailleurs, où la vitesse de multiplication est sensiblement la même ; qu'au-dessus de cette zone le temps de génération croît graduellement ; qu'au-dessous ce temps devient brusquement plus grand, et que la poussée n'est plus possible quand l'acidité augmente encore (vers pH 4, par exemple). En même temps, ils constatèrent que l'inhibition de la poussée dépendait non seulement du pH, mais aussi de la nature même de l'acide, l'acide acétique, par exemple, étant plus toxique que l'acide chlorhydrique.

Les auteurs étudièrent aussi l'influence de la concentration en ions H sur la phase de latence et sur la phase de multiplication ralentie. Ils montrèrent notamment que si l'on porte des cellules d'un milieu neutre dans un milieu alcalin, la phase de latence est plus longue.

La même année, P. F. CLARK et N. H. RUEHL (21) présentèrent une étude fort importante sur les changements morphologiques qui se produisent chez les microbes aux diverses phases de la poussée. Quand nous exposerons nos propres résultats, nous montrerons tout l'intérêt de cette publication. Bornons-nous à signaler ici une idée, sinon nouvelle (elle avait déjà été émise par RAHN pour la phase de latence), tout au moins intéressante pour expliquer la phase logarithmique. JENNINGS avait montré que la fertilisation des Infusoires était due à une excitation (*stimulus*) qui se rapprochait beaucoup d'une lésion des organismes (*injury*). LOEB avait montré d'autre part que l'on pouvait stimuler la division cellulaire (grenouille parthénogénétique) par attaque mécanique des œufs. Se basant sur ces données, CLARK et RUEHL pensèrent que les substances toxiques, qui à des concentrations fortes arrêtent la multiplication cellulaire et amènent la destruction des microorganismes, qui à des concentrations moins fortes produisent peut-être le phénomène de latence, pouvaient, après dilution convenable, agir comme *stimulus* efficace pour provoquer la division cellulaire rapide.

La même année encore, SALTER (voir SMITH) étudia l'action de produits

(1) Cependant SHERMANN et ALBUS (94 et 95) (en 1922 et 1924) admirent que le maximum de sensibilité des bactéries pour des sels légèrement toxiques se trouvait à la fin de la période de latence et à la phase logarithmique. Au début de la période de latence les bactéries leur semblèrent moins sensibles.

colorants variés sur la croissance du *B. coli*. Il observa qu'un facteur donné pouvait agir sur une phase et non sur une autre et qu'il était aussi possible d'amener un ralentissement de la phase de latence sans influencer la phase logarithmique.

En 1920, GRAHAM SMITH (99) publia un article tout à fait documenté où il étudia non plus les phénomènes qui se passent pendant les premières heures de la poussée microbienne, mais ceux qui ont lieu à partir du premier jour, c'est-à-dire sensiblement au moment où la culture a atteint le chiffre maximum d'organismes. Ces expériences fort importantes, effectuées en utilisant la méthode des plaques de gélose, peuvent se résumer ainsi :

1°) Si onensemence, avec un petit nombre de staphylocoques dorés, des milieux de culture neutralisés, préparés simplement avec un extrait de viande, sans sel ni peptone, et si l'on place ce milieu à 37°, il se produit une multiplication très rapide durant le 1^{er} jour, puis une multiplication plus lente le 2^e et enfin un arrêt quand le nombre maximum est d'environ 1 milliard par centimètre cube. Ensuite, le nombre des organismes vivants décroît, d'abord rapidement, puis plus lentement, jusqu'à ce qu'il atteigne un niveau assez bas qui reste à peu près constant pendant une longue période ou tombe fort lentement. Durant cette période de constance relative on observe de faibles oscillations du nombre.

2°) Il semble que l'on puisse modifier, jusqu'à un certain point, la rapidité de ces phénomènes, en procédant, avant l'ensemencement, à de nombreux repiquages. Plusieurs transplantations se succédant rapidement, par exemple, sur gélose inclinée, amènent, après repiquage dans le milieu liquide utilisé plus haut, une croissance accélérée, un maximum élevé et une chute des nombres très rapide. Inversement, si l'on utilise une souche moins souvent repiquée, il semble que le chiffre maximum soit atteint plus lentement, qu'il soit plus bas et que la période de déclin soit plus reculée.

3°) Le degré de multiplication semble finalement être en relation avec la quantité d'extrait de viande existant dans la culture. La multiplication est d'autant plus grande que la proportion d'extrait de viande est plus forte dans le milieu ensemencé.

4°) La forme de la courbe de croissance est influencée par le nombre de cocci ensemencés ; avec un faible ensemencement, le nombre maximum ne dépasse pas un milliard à 1.200.000.000 par centimètre cube. Si on ensemence directement un nombre de microbes atteignant ce chiffre, la multiplication a lieu relativement lentement pendant 2 jours, puis il se produit une chute rapide.

5°) Si les nombres ensemencés sont différents, mais faibles, les résultats, après 24 heures d'incubation, sont très voisins.

6°) Si, après avoir atteint la période de destruction des bactéries, on ajoute de petites gouttes d'extrait de viande en solution concentrée (gouttes de volume insuffisant pour amener une dilution appréciable), une multiplication nouvelle se déclanche, sensiblement proportionnelle à la quantité de substance nutritive ajoutée. La chute des nombres qui suit l'accroissement initial n'est donc pas due à l'accumulation de produits nuisibles, mais semble causée surtout par la disparition de la substance nutritive.

7°) Par de faibles, mais régulières additions de substances nutritives, une concentration définie de staphylocoques peut être maintenue pendant une longue période. Il semble cependant que l'accumulation des produits microbiens puisse graduellement empêcher la croissance, mais ce dernier point n'est pas absolument évident.

8°) Une dilution modérée de la culture avec de l'eau distillée a peu d'action. Le nombre d'organismes dans chaque unité standard est proportionnel à la dilution.

9°) La température d'incubation a une grande influence sur le cours de la poussée bactérienne :

A 37°, la multiplication durant les 24 premières heures est très rapide, le maximum est atteint le 2° ou le 3° jour, puis la décroissance est très rapide ;

A 27°, le maximum est atteint vers le 5° ou le 6° jour, et il est considérablement plus grand qu'à 37° ;

A 17°, la multiplication, très lente pendant 48 heures, devient ensuite rapide, et le maximum, plus haut qu'à 27°, est atteint le 8° jour ; le déclin est lent.

A 8°, il y a, parfois, une très légère multiplication pendant le premier jour, suivie d'un déclin qui dure au moins 60 jours.

Aux températures plus basses, les nombres tombent rapidement et les cultures meurent.

10°) Si des cultures de *Staphylococcus aureus*, *B. pyocyaneus*, *B. coli* sont réensemencées avec l'espèce originellement présente, il ne se produit qu'une poussée faible ou nulle ; mais si elles sont réensemencées avec un des autres organismes, il se produit une multiplication nette. Dans des cultures stérilisées par ébullition la souche originale peut aussi se multiplier à nouveau.

On voit donc quelle ampleur le travail de SMITH a atteinte. Et il est dommage que cet auteur ait négligé l'étude des premières heures de la poussée microbienne ; néanmoins, il a abordé à peu près tous les problèmes qui peuvent se poser à l'occasion de l'étude de la multiplication bactérienne. Et encore n'avons-nous pas parlé de bien d'autres expériences qu'il a faites sur les divers milieux de culture : influence de l'addition de solutions acides neutres ou basiques ; influence de l'addition de glucose ; influence du mode de stérilisation ; comparaison de la valeur nutritive des milieux gélosés et gélatinés.

Il est curieux de constater que SMITH, par l'interprétation qu'il a donnée de ses expériences, semble se rallier complètement à l'idée que, dans la poussée microbienne, les divers phénomènes sont liés à la présence ou à l'absence de matières nutritives. MAC KENDRICK et PAI (68) exceptés, tous les auteurs précédents avaient admis une conclusion tout à fait différente.

En 1922, WILSON (105) a étudié la poussée microbienne simultanément par les deux méthodes suivantes :

1°) numération directe, au microscope, de la totalité des microorganismes ;

2°) numération des microbes « viables » par ensemencement sur gélose.

Il constata que généralement le nombre des microbes « viables » n'atteint pas le nombre total, le rapport étant, en moyenne, à la fin de la période logarithmique, de $\frac{65}{100}$

L'histoire antérieure de la culture pouvant avoir une influence sur ce fait, il effectua, sans obtenir de résultats nets, des essais avec des cultures, vieilles, récentes et très jeunes (3 heures). Même dans ce dernier cas, le nombre des bactéries « viables » fut toujours plus bas que le nombre total. Pourtant, dans quatre de ses expériences, il remarqua que ces deux nombres pouvaient se rapprocher et même se maintenir identiques pendant quelque temps (50 minutes environ). Mais il ne put trouver pourquoi ces expériences présentèrent cette anomalie.

Pour terminer cette revue des travaux étrangers, signalons que des mises au point intéressantes parurent dans ces dernières années.

BUCHANAN dans le livre de BUCHANAN et FULMER, puis dans le traité de JORDAN et FALK, publia deux études sur la poussée microbienne dans les milieux artificiels.

WINSLOW (106), dans le traité de JORDAN et FALK, exposa ce que l'on connaît actuellement sur la multiplication des bactéries dans les milieux naturels tels que l'eau, le sol, les matières alimentaires, etc...

VUE D'ENSEMBLE DE LA POUSSÉE MICROBIENNE TELLE QU'ELLE RÉSULTE DES TRAVAUX QUE NOUS VENONS D'EXPOSER

Si on ensemence des microorganismes dans un milieu de culture convenable et si l'on suit, comme l'ont fait tous les auteurs [sauf BARBER (5)], la multiplication bactérienne par numération des colonies poussant sur plaques de bouillon gélosé ou gélatiné, on constate les faits suivants.

Pendant un certain temps, il n'y a pas d'accroissement apparent du nombre, puis la multiplication commence et les nombres grandissent d'abord lentement, puis de plus en plus rapidement, jusqu'à ce que les cellules se divisent à une vitesse uniforme. Au bout d'un certain temps, la vitesse de division des cellules diminue et finalement la poussée cesse entièrement. Les microorganismes présents restent en nombre constant pendant un temps plus ou moins court ; puis bientôt, les cellules commencent à mourir. Une observation suffisamment prolongée montre que, ou bien toutes les bactéries meurent, ou bien un certain nombre, assez faible, parvient à subsister.

Ainsi il est possible de distinguer dans la poussée microbienne différentes phases qui, suivant les organismes étudiés et les conditions de la poussée, seront plus ou moins longues et pourront, en quelque sorte, empiéter les unes sur les autres.

Suivant les dénominations utilisées par les auteurs que nous avons étudiés, nous appellerons les différentes phases :

- I. — Phase de latence,
- II. — Phase de poussée constante et rapide, dite phase de multiplication géométrique ou logarithmique,
- III. — Phase de multiplication ralentie,
- IV. — Phase de maximum stationnaire,
- V. — Phase de destruction des bactéries (1).

Nous allons maintenant étudier un peu plus en détail les diverses phases de la poussée, tâcher de mettre en lumière les facteurs qui influent sur chacune d'elles et d'expliquer, selon les conceptions des auteurs cités, l'existence de ces phases.

I. — Phase de latence.

a) DÉFINITION. — C'est la phase qui sépare le moment de l'ensemencement du moment où la multiplication s'effectue avec une vitesse uniforme et rapide.

Elle a été vue pour la première fois par MÜLLER (74) en 1895 et la même année par FULLER. Depuis elle a été retrouvée par la plupart des auteurs.

Elle a été divisée en deux parties par BUCHANAN (10) en 1918, qui y a distingué : une partie initiale stationnaire pendant laquelle le nombre des bactéries reste constant, et une deuxième partie où les bactéries commencent à se multiplier et accélèrent peu à peu leur vitesse de multiplication. Ces deux parties ne se distinguent vraiment que dans la germination des spores. Il ne nous semble donc pas nécessaire, pour les microbes non sporulés qui ont presque toujours été utilisés, d'admettre la division supplémentaire un peu théorique établie par BUCHANAN (2).

La durée de la phase de latence peut varier ; avec les conditions ordinaires (bouillon ordinaire, souche de 24 heures, ensemencement de plusieurs millions, température d'incubation 37°), elle se prolonge 2 à 3 heures.

b) FACTEURS QUI EXERCENT UNE INFLUENCE SUR LE TEMPS DE LATENCE.

1°) *Influence de la constitution des milieux de culture.* — La durée de la phase de latence varie avec la composition des différents milieux, en particulier avec le pH. La latence diminue quand les bactéries sont repiquées dans un milieu auquel elles sont déjà accoutumées [HEHEWERTH (50), COPLANS (23), PENFOLD (78), COHEN et CLARK (22)].

2°) *Influence de la température d'incubation.* — La latence est d'au-

(1) Pourtant d'autres auteurs tels que WINSLOW (106) étudiant plus spécialement l'accroissement et la diminution des populations bactériennes dans les milieux naturels tels que le sol, les eaux, etc..., appellent ces différentes phases : a) phase d'ajustement, b) phase d'accroissement, c) et d) phases de crise, e) phase d'abaissement, et considèrent qu'il y a une dernière phase, f) phase de réajustement.

(2) Il faut remarquer cependant que certains auteurs, comme MYER COPLANS (23), LANE CLAYTON (63), PENFOLD (78) ont constaté quelquefois, au début de la période de latence, qu'il y avait non seulement maintien du nombre même des microbes ensemencés, mais même diminution de ce nombre. La remarque de BUCHANAN a donc une certaine valeur même pour les microbes non sporulés.

tant plus longue que la température est plus basse [HEHEWERTH (50), OTTO RAHN (81), LANE CLAYPON (63), H. CHICK (19), PENFOLD (78)].

3°) *Influence de l'espèce microbienne.* — La latence est différente pour chaque espèce microbienne [HEHEWERTH (50), LANE CLAYPON (63)].

4°) *Influence de l'âge des microbes lors de l'ensemencement.* — Les cultures vieilles donnent des temps de latence plus prolongés que les cultures jeunes [MÜLLER (74), HEHEWERTH (50), OTTO RAHN (81), COPLANS (23), ALAN M. CHESNEY (18), PENFOLD (78)]. La latence peut même disparaître quand on ensemence une bactérie très jeune, soit de 2^e ou 3^e génération [BARBER (5)], soit âgée de 3 à 5 heures (MAC KENDRICK et PAÏ, PENFOLD, ALAN M. CHESNEY).

5°) *Influence du nombre des microbes ensemencés.* — Ce point particulier n'est pas nettement éclairci. La latence peut diminuer par ensemencement d'un grand nombre de germes (OTTO RAHN). Pour PENFOLD, les résultats ne sont pas nets.

6) *HYPOTHÈSES ÉMISES POUR EXPLIQUER L'EXISTENCE DE LA PHASE DE LATENCE.* — Les premiers auteurs ont donné une importance considérable au phénomène de latence et ils ont émis pour l'expliquer de nombreuses hypothèses. Quelques-unes ont très vite perdu toute valeur ; et celles qui subsistent sont fort difficiles à vérifier. Si bien qu'à l'heure actuelle, en se basant sur les essais des auteurs que nous avons cités, il est impossible d'expliquer l'existence de la phase de latence.

Nous allons examiner rapidement ces diverses hypothèses.

1°) *Théorie de l'adaptation.* — Proposée par les premiers auteurs, abandonnée assez rapidement, la latence subsistant quand on effectue des repiquages en série d'un milieu dans un même milieu.

2°) *Théorie de la sécrétion diastasique.*

3°) *Théorie de la sécrétion accélérante subtoxique.*

4°) *Théorie de l'apport par les bactéries ensemencées d'une substance nécessaire à la multiplication.*

Ces trois théories ont été proposées par OTTO RAHN (81), qui n'a pas pu les vérifier, comme nous l'avons vu plus haut.

5°) *Théorie de l'agglutination.* — Les bactéries s'agglutineraient pendant les premières heures de la poussée, et la numération sur plaques serait inexacte (H. CHICK) (19). L'expérience a montré l'inexactitude de cette hypothèse.

6°) *Théorie du rétablissement d'un dommage (injury) subi par la bactérie.* — La phase de latence devrait être considérée comme le temps nécessaire pour que la bactérie, lésée avant son ensemencement par les produits du métabolisme microbien, puisse reprendre son intégrité après ensemencement dans un milieu neuf. [ALAN M. CHESNEY (18)]. Cette théorie fut discutée par PENFOLD (78) qui ne la vérifia pas entièrement.

7°) *Théorie de l'apport par les bactéries d'une certaine quantité de substance nuisible.* — Proposée par ELKMAN (31). N'a pu être vérifiée par PENFOLD (78).

8°) *Théorie de la sélection.* — Les bactéries étant différentes, il se ferait une sélection de celles capables de se reproduire plus rapidement [PENFOLD (78)].

9°) *Théorie de la synthèse par échelons des corps protoplasmiques.* — La phase de latence durerait le temps nécessaire pour que les substances intermédiaires synthétisées par échelons aient atteint la concentration capable d'assurer la croissance logarithmique [PENFOLD (78)]. La latence pourrait diminuer ou même disparaître en remplaçant les « corps intermédiaires » de PENFOLD par des aliments tels que amino-acides, amines simples, etc... [RETTGER (85) (1918)].

10°) *Théorie de l'inertie.* — Suivant cette conception, les bactéries auraient à vaincre une « inertie » avant d'atteindre leur valeur maxima de poussée. Le mot « inertie » ne nous semble pas beaucoup plus explicite que celui de « latence ».

Remarquons cependant que BUCHANAN (10) considère cette théorie comme étant « à quelque égard, la meilleure proposée ».

11°) *Théorie de la germination.* — Les microbesensemencés pourraient être considérés non pas comme des microbes ordinaires, mais comme des microbes à l'état de « repos », sans qu'il soit possible de différencier des organes de résistance se rapprochant des spores ou arthrospores. La période de latence ne serait alors que la phase de germination, bien connue pour d'autres phénomènes (BUCHANAN).

Ainsi, malgré tous les travaux consacrés à la phase de latence, malgré les nombreuses théories émises pour l'expliquer, il apparaît que nous ne pouvons, pour le moment, donner aucune explication vraiment indiscutable de ce phénomène.

II. — Phase logarithmique.

C'est la phase pendant laquelle le temps de génération (c'est-à-dire le temps nécessaire pour qu'il y ait, par bipartition, formation d'un nombre double de bactéries) se maintient constant et aussi rapide que le permettent les conditions intérieures et extérieures.

Cette phase a été vue pour la première fois par MÜLLER (74) (1895) ; BÜCHNER, LONGARD et RIEBLIN (14) (1887) avaient, les premiers, défini et mesuré le temps de génération.

Cette phase est appelée phase de multiplication géométrique, car la multiplication est géométriquement accélérée, les microbes devenant dans le même laps de temps toujours deux fois plus nombreux ; 2 donnent 4, qui donnent 8, qui donnent 16, 32, 64, 128, etc...

Cette phase est encore appelée phase logarithmique car si, sur un graphique, on porte, en fonction des temps, les logarithmes des nombres de microbes, on constate que pendant cette phase, les points se placent en ligne droite.

Les recherches effectuées pour bien connaître la phase logarithmique sont beaucoup moins nombreuses que celles qui concernent la phase de latence. Il est pourtant évident que nous avons dans cette phase le type même de la poussée microbienne théorique. Il est possible de concevoir en pensée, un milieu de culture où les conditions se maintiendraient intactes et où, par conséquent, la phase logarithmique se prolongerait indéfiniment. C'est ce que l'on réalise grossièrement en repiquant sans cesse dans le même milieu, les bactéries prélevées en pleine période logarithmique. C'est ce qu'a réalisé BARBER (5) par ses repiquages d'unités peu nombreuses ou isolées.

Le rythme de cette multiplication constante, exprimé par le temps de génération, traduirait alors de façon nette la qualité du milieu de culture. Le meilleur milieu serait évidemment celui qui donnerait la multiplication la plus rapide, c'est-à-dire le temps de génération le plus court.

Dans les conditions ordinaires de la culture microbienne, la phase de multiplication logarithmique est rapidement modifiée par les changements de toutes natures qui se produisent dans les milieux de culture du fait même de la poussée des microbes. A la notion, que nous exprimions tout à l'heure, du rythme de la multiplication caractérisé par la grandeur du temps de génération, vient s'ajouter une notion nouvelle, celle du temps pendant lequel peut se prolonger cette phase logarithmique. Ce temps est généralement assez court, au maximum de 6 ou 8 heures, souvent moins. Il dépend des facteurs (bons ou mauvais) qui agissent sur la poussée et sert aussi à donner une idée de la qualité du milieu nutritif et peut-être encore plus à traduire les phénomènes inhibiteurs qui se produisent dans le milieu.

Nous allons examiner rapidement les facteurs qui agissent sur la phase logarithmique.

1°) *Influence de la constitution du milieu sur la phase logarithmique.* — Seul BARBER (5), travaillant dans des conditions très particulières, a trouvé que la constitution des milieux de culture était sans influence sur la poussée des bactéries.

Les autres auteurs ont trouvé que le temps de génération pendant la phase logarithmique variait avec les différents milieux [HEHEWERTH (50), Miss H. CHICK (19)], avec la concentration en principes nutritifs [PENFOLD et NORRIS (79)] et avec le pH [COHEN et CLARK (22)].

2°) *Influence de la température d'incubation.* — Le temps de génération, pratiquement infini au-dessous de 10°, diminue rapidement quand la température s'élève, atteint un minimum vers 37°, se maintient sensiblement à la même valeur jusqu'à 46°, et enfin augmente rapidement pour devenir infini vers 50° [MÜLLER (74), BARBER (5), LANE CLAYPON (63)].

D'autre part, la durée de la phase logarithmique est d'autant plus courte que la température est plus élevée. [LANE CLAYPON (63), Miss H. CHICK (19), REED et REYNOLDS (82)].

3°) *Influence de l'espèce microbienne.* — Le temps de génération et la durée de la phase logarithmique varient pour les diverses espèces microbiennes [HEHEWERTH (50), LANE CLAYPON (63), Miss CHICK (19), REED et REYNOLDS (82), GRAHAM SMITH (99)].

4°) *Influence de l'âge des microbesensemencés.* — Cette influence, si importante quand il s'agit de la phase de latence, n'existe plus pour la phase logarithmique où nous avons affaire, dans tous les cas, à des microorganismes, de nouvelle formation, datant de la phase de latence.

5°) *Influence du nombre des microbesensemencés.* — Ce facteur a été très peu étudié pour la phase logarithmique. Tout au plus peut-on signaler un travail de LANE CLAYPON (63) qui a remarqué que la phase logarithmique était d'autant plus courte que lesensemencements étaient plus grands.

Dans l'ensemble, donc, comme nous l'avons déjà dit, la phase logarithmique a été bien moins étudiée que la phase de latence. Ceci est d'autant

plus curieux que la phase de multiplication rapide est caractéristique du milieu, du microbe et en général de toutes les conditions de la culture. Seuls des auteurs modernes, tels que COHEN et CLARK (22) ont aperçu toute l'importance de cette phase.

Par contre, en raison de son mécanisme fort clair, elle est très bien connue au point de vue mathématique [PENFOLD et LEDINGHAM (64), SLATOR (98)].

III. — Phase de multiplication ralentie.

Pendant cette phase, la multiplication se ralentit peu à peu ; le nombre des bactéries augmente, mais de plus en plus lentement, les temps de génération deviennent de plus en plus grands et tendent vers l'infini. Cette phase est généralement assez longue, elle peut durer de 12 à 24 heures.

C'est la phase banale où l'on se place, presque toujours inconsciemment, quand on examine une culture après un ensemencement de la veille. Dans cette période où les facteurs d'inhibition entrent en jeu, on assiste au ralentissement de la multiplication, soit parce qu'un certain nombre de bactéries meurent, soit parce que tous les microbes restant vivants, le rythme de la multiplication totale se trouve de plus en plus ralenti.

Cette période a été très peu étudiée malgré l'intérêt qu'elle présente.

Quelques hypothèses ont été émises pour expliquer ce ralentissement de la poussée microbienne ; nous les examinerons plus loin, car elles s'appliquent également à la phase suivante.

IV. — Phase de maximum stationnaire.

Pendant cette phase, il n'y a plus d'accroissement du nombre des bactéries qui se maintient sensiblement constant pendant quelques heures.

La durée de cette phase et le nombre maximum de microbes obtenus n'ont pas été très étudiés. Pourtant ce nombre est en rapport direct avec la valeur de la poussée, par conséquent avec la qualité du bouillon et la qualité du microbe.

Ce nombre maximum dépend, d'après SMITH (99), de la composition des milieux de culture, de la température d'incubation et du nombre de microbes ensemencés.

HYPOTHÈSES ÉMISES POUR EXPLIQUER LE RALENTISSEMENT PUIS L'ARRÊT DE LA POUSSÉE MICROBIENNE.

Peu de bactériologistes se sont préoccupés des causes déterminant l'arrêt de la poussée rapide logarithmique, le ralentissement de plus en plus grand de la multiplication et finalement l'arrêt absolu de la poussée. [EIJKMAN (31), OTTO RAHN (81), MAC KENDRICK et PAÏ (68), GRAHAM SMITH (99)].

Les hypothèses qu'ils ont émises, plutôt contradictoires, sont les suivantes :

Soit épuisement progressif, puis total des gros matériaux nutritifs, carbone, azote, phosphore, ou des matériaux nutritifs moins grossiers et

moins connus, acides aminés particuliers, vitamines spéciales de croissance ;

Soit production, du fait même du métabolisme microbien, de substances de déchets nuisibles (acides, ammoniac) ;

Soit sécrétion par les microbes mêmes de substances analogues à des toxines qui viendraient « vacciner » le milieu contre ces microbes.

V. — Phase de destruction des bactéries.

Pendant cette phase le nombre des bactéries décroît d'abord lentement, puis plus rapidement, pour enfin, soit se stabiliser à un taux assez bas, soit devenir nul.

Pour BUCHANAN (10) la phase de destruction rapide serait, elle aussi, logarithmique ; c'est-à-dire que la courbe des logarithmes des nombres en fonction des temps serait une droite.

Ces phénomènes de destruction des microbes ont été beaucoup moins étudiés que les phénomènes de poussée. Ils sont probablement de même ordre que les actions antiseptiques pures étudiées par des auteurs tels que PAUL et KRÖNIG, MADSEN et NYMAN, Miss H. CHICK, REICHENBACH, etc...

Ces phénomènes seront traités en détail dans un autre travail et nous n'y insisterons pas ici.

CHAPITRE III

ESSAIS PERSONNELS

MÉTHODES EMPLOYÉES. — RÉSULTATS OBTENUS

Dans le précédent chapitre, nous avons vu comment, d'après les travaux des divers auteurs qui nous ont précédée, il était possible d'envisager actuellement la poussée microbienne. Nous avons vu, en particulier, que si la plupart d'entre eux sont d'accord au sujet des diverses phases de la poussée, cet accord cesse lorsqu'il s'agit de les expliquer ; la phase de latence a, en particulier, provoqué de nombreuses discussions, qui n'ont pour le moment abouti à aucun résultat.

En 1927, J. RÉGNIER et S. LAMBIN (84), étudiant l'évolution d'un bacille pyocyanique, par la méthode de numération microscopique directe, n'ont pas retrouvé la phase de latence.

Ils ont supposé que ce résultat pouvait s'expliquer par la grandeur de l'ensemencement (10 millions de germes par centimètre cube, chiffre bien plus grand que ceux qui avaient été utilisés jusqu'ici).

A la suite de ces auteurs, nous nous sommes proposé d'étudier la poussée microbienne en milieu liquide, et spécialement l'influence, sur l'évolution de la culture, de la grandeur de l'ensemencement.

Nos expériences ont porté sur des ensemencements variant de 250.000 germes par cm^3 à 10 milliards de germes par cm^3 .

Comme nous l'avons déjà fait remarquer tous les auteurs, sauf HEHERWERTH (36), BARBER (5) et WILSON (105), ont utilisé exclusivement les méthodes de numération sur plaques de gélatine ou de gélose. J. RÉGNIER et S. LAMBIN ont employé la méthode de numération microscopique indirecte.

Pour que nos chiffres puissent être comparés à ceux de tous ces auteurs, nous avons toujours effectué les numérations simultanément par les deux méthodes suivantes :

1°) Méthode de numération sur plaques de gélose donnant le nombre de germes capables de se multiplier après ensemencement sur gélose ;

2°) Méthode de numération microscopique indirecte, basée sur le principe de la méthode de WRIGHT, donnant le nombre total de bactéries existant dans le milieu, méthode déjà utilisée, en 1927, par J. RÉGNIER et S. LAMBIN.

Nous allons à présent exposer en détail les techniques que nous avons utilisées et la façon dont nous avons conduit nos expériences.

Puis nous donnerons les résultats que nous avons obtenus.

Microbe utilisé

Nous nous sommes servi, comme J. RÉGNIER et S. LAMBIN, du bacille pyocyanique. Ce microbe est très vivace, pousse rapidement, donne des colonies régulières. Ses cellules filles se séparent facilement et ne produisent que très peu de ces longues chaînes, qui, gênantes dans la numération directe, causent des erreurs très importantes dans la numération par ensemencement. Il est, en principe, de forme nette et de dimensions assez grandes. Pourtant, nous verrons plus loin qu'il subit, au début de la poussée, des changements morphologiques importants.

Pendant toute la durée de nos expériences, nous avons utilisé la même souche bactérienne : une souche de bacille pyocyanique typique isolé et identifié aux Travaux Pratiques de Bactériologie de la Faculté de Pharmacie. Sa bonne conservation était assurée par des repiquages réguliers sur gélose, avec de temps en temps des passages sur gélatine.

Milieux de Culture

Tous nos essais ont été effectués en bouillon.

Pour qu'il soit aussi constant que possible, nous avons préparé ce bouillon avec de l'extrait de viande Liebig, de la façon suivante :

Dissoudre à feu doux :

Extrait de viande Liebig.....	10 gr.
Peptone bactériologique Byla....	20 gr.
NaCl	5 gr.

dans un litre d'eau distillée.

Ajuster à pH 7,0 (méthode colorimétrique de CLARK et LUBS) par addition ménagée de NaOH ou HCl dilués.

Porter à l'autoclave à 120° pendant 15 minutes, et filtrer chaud sur filtre ébouillanté.

Répartir.

Stériliser à 115° pendant vingt minutes.

Le bouillon était réparti à raison de 50 ou 100 cm³ dans des fioles d'Erlenmeyer ou des ballons en Pyrex renfermant des billes de verre.

Notons que nous avons, dès le début, mis en réserve une quantité d'extrait Liebig et de peptone telle qu'elle a pu nous suffire pour toute la durée de notre travail. Ainsi le bouillon servant à nos ensemencements a été régulièrement le même.

Le bouillon gélosé servant à la conservation des souches et à la préparation des plaques était préparé de la façon suivante :

Mettre 30 gr. de gélose sèche coupée en petits morceaux à macérer pendant 1 heure dans l'eau, l'exprimer et la mettre dans 1.000 cm³ de bouillon à l'extrait de viande de Liebig.

Chauffer à l'ébullition, vérifier le pH qui doit être 7,0 et l'ajuster s'il y a lieu.

Porter le mélange à l'autoclave à 120° pendant 45 minutes.

Filtrer chaud sur papier Chardin ébouillanté, en maintenant l'appareil à filtration dans l'autoclave ouvert, en vapeur fluente.

Répartir.

Stériliser à 115° pendant 20 minutes.

Le bouillon gélosé était réparti à raison de 5 à 6 cm³ dans les tubes destinés à être inclinés, et de 12 à 15 cm³ dans les tubes destinés à être conservés en culot, et à être utilisés pour les plaques.

Les tubes, fioles et ballons de gélose ou de bouillon étaient capuchonnés et conservés au frais

Numération des colonies sur plaques de gélose

Quelques expériences préliminaires nous ont montré qu'il fallait, pour que la numération à l'œil nu ou à la loupe soit aisée et précise, que le nombre des colonies ne dépasse pas 400 ou 500 par plaques.

Nous effectuons des dilutions de telle sorte que la dernière renferme de 50 à 500 bactéries par unité de volume. Il est facile, avec un peu d'expérience, de décider du nombre de dilutions qu'il convient de faire pour arriver à ce résultat.

Les dilutions sont faites dans du sérum physiologique stérile (à 0,8 % de chlorure de sodium) à l'aide de pipettes stériles exactement graduées. Chaque prélèvement est de 1 centimètre cube. Ce volume étant relativement grand, l'erreur faite à chaque prélèvement, déjà très faible par elle-même si l'on opère soigneusement, devient alors pratiquement négligeable.

Le sérum physiologique est réparti soit dans des tubes à essais, soit dans des ballons ou des fioles d'Erlenmeyer, renfermant des billes de verre, à raison de 9 cm³ ou 10 cm³ par tube à essai et de 100 cm³ par ballon, quantités qui permettent d'obtenir toutes les dilutions nécessaires. L'expérience ayant démontré dès le début de nos essais que les récipients de verre ordinaire étaient trop fragiles, nous avons toujours employé des tubes, ou ballons, ou fioles d'Erlenmeyer en verre pyrex qui, plus épais, résiste mieux aux chocs répétés des billes de verre.

Avant chaque prélèvement de 1 cm³, l'émulsion microbienne, que ce soit le bouillon de culture chargé de bactéries, ou l'une quelconque des dilutions en eau salée, doit être agitée très vivement. L'agitation de la suspension bactérienne est faite, non pas en remuant circulairement le milieu, ce qui crée simplement des mouvements réguliers de la masse entière, mais en procédant à des agitations vives dans tous les sens, de façon à obtenir des mouvements irréguliers et rapides des billes de verre dans le liquide.

La dernière dilution étant obtenue, on ensemence trois tubes renfermant de la gélose préalablement fondue et maintenue à 45° C., chacun avec 1 cm³ de cette dilution. Le mélange est coulé dans des boîtes de Pétri stériles. Après refroidissement et solidification de la gélose, les boîtes de Pétri sont mises à l'étuve à 37° C. et la numération des colonies est faite

au bout de 48 heures ou de 72 heures, l'expérience ayant montré que les résultats après 48 heures ou 72 heures sont les mêmes ; la numération est peut-être un peu plus aisée après 72 heures, car les colonies sont plus nettes.

On prend la moyenne des trois numérations, et en tenant compte du nombre et du taux des dilutions, il est facile de connaître le nombre de microbes vivants contenus dans 1 cm³ de suspension bactérienne.

Méthode de numération microscopique indirecte

La méthode que nous avons employée est basée sur les mêmes principes que la méthode de WRIGHT. Nous avons utilisé une modification de la technique déjà employée par J. RÉGNIER et S. LAMBIN.

Au lieu d'hématies, nous nous sommes servi, comme le faisait FRIES (37) de cellules de levure. Après avoir utilisé au début des cultures de *Saccharomyces pastorianus* sur carottes, émulsionnées dans du sérum physiologique, nous avons été amenée à nous servir simplement de levure de boulangerie.

Après quelques essais, nous avons adopté la technique suivante pour la préparation de l'émulsion de levure :

Des fragments de levure bien fraîche sont mélangés avec précaution, dans un petit mortier de verre, avec quelques gouttes de sérum physiologique, de façon à obtenir une pâte lisse et homogène qui est versée dans une fiole d'Erlenmeyer renfermant des billes de verre ; le mortier est rincé avec du sérum physiologique, et l'émulsion de levures diluée de façon à obtenir le titre voulu. On y ajoute alors 4 à 5 cm³ de chloroforme, de façon à tuer les levures.

L'émulsion ainsi préparée, bien agitée avec les billes de verre, est homogène et ne montre pas d'amas de cellules levures au microscope.

La numération de l'émulsion se fait à l'aide d'un hématimètre de Malassez après dilution au 1/10. Nous comptons en général 3 ou 4 rectangles de chacun 20 carrés.

Nous avons commencé par employer des émulsions de levures renfermant environ 150 millions de levures par cm³. Mais nous avons rapidement utilisé des taux plus élevés : les émulsions à 250 millions environ par cm³ nous ont paru les plus commodes.

Des numérations faites chaque jour pendant 2 semaines nous ont donné des chiffres constants, les différences journalières étant extrêmement faibles, autour d'un chiffre moyen et n'atteignant pas la limite des erreurs d'expérience (5 % environ).

Pourtant nous n'avons jamais utilisé les émulsions de levures pendant plus de 8 ou 10 jours, car nous avons constaté qu'au bout de ce temps, les cellules se colorent plus mal, et sont donc plus difficiles à compter. Il se produit sans doute à ce moment un début d'autolyse.

Les numérations se font sur un mélange de 1 cm³ d'émulsion de levure et 1 cm³ d'émulsion bactérienne (suspension en sérum physiologique, culture pure ou diluée).

Répetons ici que tous les prélèvements sont faits après agitation longue

et soigneuse des suspensions de levures et de bactéries, en présence de billes de verre, à l'aide de pipettes stériles et avec toutes les précautions d'usage (1).

Le prélèvement du mélange levures et bactéries s'effectue à l'aide de pipettes Pasteur et l'étalement se fait sur des lames propres, soigneusement dégraissées et conservées dans l'alcool ammoniacal, avec une pipette Pasteur très fine ou une anse de platine. Les préparations sont séchées par agitation vive à l'air et colorées par la technique de TRIBONDEAU. Nous avons choisi ce procédé de coloration, parce que la fixation et la coloration se font en une seule opération et qu'un seul lavage terminal à l'eau distillée est nécessaire. Il faut, bien entendu, effectuer ce lavage avec les plus grandes précautions.

Après dessiccation, les lames sont examinées au microscope, à l'immersion.

Les microbes sont très nettement colorés en bleu violacé, les cellules levures sont plus foncées et se distinguent aisément, par leurs dimensions, leur forme et leur coloration.

Il est indispensable de préparer plusieurs lames (quatre en général) et d'examiner sur chacune d'elles un très grand nombre de champs (jamais moins de 50, de préférence plus de 100).

Pour toutes nos numérations, nous avons utilisé le même système optique : oculaire N° 3 et objectif à immersion au 1/15. La tâche nous a été facilitée par l'emploi d'un microscope, comportant une platine à déplacement rectangulaire munie d'un dispositif permettant de déplacer un champ à la fois (système RADAIS).

Ainsi connaissant d'une part le nombre de levures par cm^3 , et d'autre part la proportion relative obtenue par numération au microscope, il suffit d'un calcul très simple pour connaître la quantité de microbes contenus dans 1 cm^3 de l'émulsion bactérienne étudiée.

Par exemple, nous donnons ci-dessous les chiffres d'une de nos numérations :

Emulsion de levures : 240.000.000 par cm^3 .

On a compté dans le mélange fait à parties égales d'émulsion de levures et d'émulsion microbienne, 494 levures pour 2.012 bactéries ;

1 cm^3 d'émulsion bactérienne renferme donc :

$$\frac{240.000.000 \times 2.012}{494} = 977.000.000 \text{ bactéries par } \text{cm}^3.$$

MARCHE SUIVIE POUR NOS EXPÉRIENCES

Toutes nos expériences ont été faites strictement dans les mêmes conditions, en faisant varier seulement le facteur que nous désirions étudier, c'est-à-dire le nombre de bactéries ensemencées.

(1) Le mélange levures et bactéries a toujours été effectué dans des tubes stériles renfermant quelques billes de verre. Nous aurions pu, à la rigueur, utiliser des tubes non stériles.

L'ensemencement était fait dans des fioles d'Erlenmeyer ou des ballons de pyrex renfermant 100 cm³ ou 50 cm³ du bouillon, dont nous avons donné la formule plus haut, avec une culture de bacille pyocyanique sur gélose inclinée, après incubation de 24 h. à 37°.

Le récipient était alors placé immédiatement à l'étuve à 37° et y restait aussi longtemps que duraient les expériences.

Les prélèvements étaient effectués à intervalles réguliers au bout de 2 h., 4 h., 6 h., 8 h., 24 h., 30 h., et 48 h. (rarement 50 ou 52 h.) après l'ensemencement, puis continués chaque jour pendant la première semaine et tous les 2 ou 3 jours pendant la deuxième et la troisième semaine, quand les expériences ont duré plus de 48 heures.

Lors de chaque prélèvement, nous avons procédé simultanément aux deux méthodes de numération que nous avons décrites en détail :

Numération microscopique de tous les éléments microbiens morts et vivants ;

Numération sur plaques de gélose des éléments capables de se reproduire sur ce milieu.

En raison des différences considérables existant dans les nombres de bactéries ensemencées — ces nombres ont varié de 250.000 à 10 milliards par cm³ — nous avons dû employer pour l'ensemencement même deux procédés légèrement différents.

Pour les ensemencements de 250.000 à 10.000.000 de bactéries par cm³, nous préparions une émulsion de microbes en sérum physiologique ; après numération microscopique de l'émulsion, nous ensemencions dans le bouillon nutritif la quantité voulue de cette émulsion à l'aide de pipettes de 1 cm³ graduées en centièmes de centimètre cube. Pour les ensemencements allant de 50 millions à 10 milliards de bactéries par cm³, nous émulsionnions directement les bactéries dans le milieu.

Disons dès maintenant que les résultats obtenus avec les deux procédés ont été très comparables.

Nous allons exposer en détail une de nos expériences.

EXPÉRIENCE B (5 Juin 1928)

Ensemencement : 500.000 microbes par centimètre cube.

a) PRÉPARATION DE L'ÉMULSION A ENSEMENCER.

Le 4 Juin, à 10 h. 1/2, nous ensemencions le bacille pyocyanique sur gélose inclinée.

Nous procédons à la numération de l'émulsion de levure qui renferme 245.000.000 d'éléments par centimètre cube.

Le 5 Juin, nous émulsionnons soigneusement 2 anses de platine de la

culture sur gélose dans 10 cm³ de sérum physiologique. C'est cette émulsion qui nous servira à l'ensemencement du bouillon après numération (1).

La numération s'effectue comme nous l'avons décrit précédemment après mélange de 1 cm³ d'émulsion de levures avec 1 cm³ d'émulsion bactérienne, étalement sur lames et numération au microscope des levures et bactéries contenues dans un certain nombre de champs microscopiques.

Nous comptons 489 levures pour 763 microbes.

Le nombre de microbes par centimètre cube est donc :

$$\frac{763 \times 245.000.000}{489} = 382.000.000 \text{ de microbes par cm}^3.$$

Diluée au 1/10, cette émulsion renferme 38.200.000 microbes par cm³.

Nous voulons ensemencer 50 cm³ de bouillon à raison de 500.000 microbes par cm³. Il faut donc ensemencer 25.000.000 de microbes, et par conséquent prendre pour cela :

$$\frac{1 \text{ cm}^3 \times 25}{38,2} = 0 \text{ cm}^3,65 \text{ de l'émulsion au } 1/10.$$

Nous prélevons 0 cm³,65 de cette émulsion à l'aide d'une pipette de 1 cm³ divisée en centièmes de cm³ et nous l'ensemencions dans une fiole d'Erlenmeyer renfermant 50 cm³ de bouillon.

Nous prélevons 1 cm³ du mélange que nous diluons dans 2 fois 100 cm³ de sérum physiologique pour faire une numération sur plaques de gélose.

Le récipient est alors placé à l'étuve à 37°, recouvert d'un capuchon.

A ce moment, le bouillon est aussi clair qu'avant l'ensemencement.

b) PRÉLÈVEMENTS.

5 Juin, 10 h. 1/2. — Ensemencement :

Nombre total de bactéries ensemencées.... **500.000** germes par cm³.

Nombre de bactéries capables de se reproduire sur gélose :

Dilution : 100 cm³ — 100 cm³.

Nombre de colonies pour 3 plaques : 29 + 40 + 25 = 94.

Soit pour 1 plaque : 31 colonies.

Nombre de microbes par cm³ de bouillon.... **310.000** germes par cm³.

12 h. 1/2 (2^e heure de l'expérience). — Bouillon encore limpide.

686 levures pour 11 microbes.

Soit **3.900.000** germes par cm³.

3 géloses : 45 — 27 — 42 colonies.

Dilution : 100 cm³ — 100 cm³.

Soit **380.000** germes par cm³.

(1) Pendant que s'effectue la numération, l'émulsion microbienne est conservée à la glacière.

14 h. 1/2 (4^e heure). — Bouillon très légèrement trouble.

993 levures pour 180 microbes.

Soit **44.000.000** germes par cm³

3 géloses : 44 — 48 — 52 colonies.

Dilution : 10 cm³—100 cm³— 100cm³.

Soit **5.280.000** germes par cm³.

16 h. 1/2 (6^e heure). — Bouillon un peu plus trouble.

400 levures pour 366 microbes.

Soit **224.000.000** germes par cm³.

3 géloses : 61 — 62 — 61 colonies.

Dilution : 100 cm³ — 100 cm³ — 100 cm³.

Soit **61.000.000** germes par cm³.

18 h. 1/2 (8^e heure). — Bouillon trouble.

202 levures pour 1.023 microbes.

Soit **1.240.000.000** germes par cm³.

3 géloses : 189 — 168 — 183 colonies.

Dilution : 100 cm³ — 100 cm³ — 100 cm³.

Soit **180.000.000** germes par cm³.

6 Juin, 10 h. 1/2 (24^e heure). — Bouillon très trouble avec voile léger facile à dissocier.

Dans le bouillon dilué au 1/11, on a 537 levures pour 1.548 microbes.

Soit, en tenant compte de la dilution, **7.766.000.000** de germes par cm³.

3 géloses : 44 — 37 — 24 colonies.

Dilution : 100 cm³—100 cm³—100 cm³—100 cm³.

Soit **3.500.000.000** de germes par cm³.

16 h. 1/2 (30^e heure). — Bouillon très trouble.

Dilué au 1/11, 408 levures pour 1.174 microbes.

Soit **7.755.000.000** de germes par cm³.

3 géloses : 54 — 42 — 44 colonies.

Dilution : 100 cm³ — 100 cm³ — 100 cm³ — 100 cm³.

Soit **4.460.000.000** de germes par cm³.

7 Juin, 10 h. 1/2 (48^e heure). — Bouillon très trouble avec dépôt, facile à rendre homogène.

Dilué au 1/11, 491 levures pour 1.928 microbes.

Soit **10.582.000.000** de germes par cm³.

3 géloses : 27 — 22 — 18 colonies.

Dilution : 100 cm³ — 100 cm³ — 100 cm³ — 100 cm³.

Soit **2.200.000.000** de germes par cm³.

8 Juin, 14 h. 1/2 (76 heures). — Bouillon très trouble avec dépôt.

Dilué au 1/11, 364 levures pour 975 microbes.

Soit 7.210.000.000 de germes par cm³.

3 géloses : 14 — 8 — 3.

Dilution : 100 cm³ — 100 cm³ — 100 cm³ — 100 cm³.

Soit 800.000.000 de germes par cm³.

9 Juin, 14 h. 1/2 (100^e heure). — Bouillon plus clair mais épais.

Dilué au 1/11, 230 levures pour 690 microbes.

Soit 8.085.000.000 de germes par cm³.

3 géloses : 168 — 160 — 140.

Dilution : 100 cm³ — 100 cm³ — 100 cm³.

Soit 171.000.000 de germes par cm³.

11 Juin, 10 h. 1/2 (144^e heure). — Bouillon moins trouble, visqueux. Les microbes sont si petits et si mal colorés qu'il n'est plus possible de faire de numération exacte.

3 géloses : 75 — 59 — 76.

Dilution : 100 cm³ — 100 cm³ — 100 cm³.

Soit 70.000.000 de germes par cm³

13 Juin, 11 h. (192^e heure). — Numération microscopique impossible.

3 géloses : 121 — 148 — 127.

Dilution : 10 cm³—100 cm³—100cm³.

Soit..... 14.500.000 germes par cm³.

15 Juin, 17 h. 1/2 (248^e heure). — Bouillon peu trouble, épais avec dépôt léger.

Numération microscopique impossible.

3 géloses : 1 — 1 — 0.

Dilution : 100 cm³ — 100 cm³.

Soit 6.600 germes par cm³.

18 Juin (312^e heure). — Numération impossible au microscope.

Sur 3 gélosesensemencées avec une dilution au 1/10, rien ne pousse.

Expérience B³
à 500.000 microbes par cm³

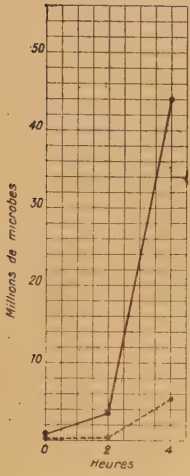
Microbes visibles

Heures	Nombre de microbes par cm ³	Logarithme des nombres de microbes	Nombre de générations	Temps de génération pendant chaque période (en minutes)
0	500.000	5.69		
2	3.900.000	6.59	3.	40
4	44.000.000	7.64	3.5	34
6	224.000.000	8.35	2.3	52
8	1.240.000.000	9.09	2.4	56
24	7.766.000.000	9.88	2.6	360
30	7.755.000.000	9.88		
48	10.582.000.000	10.02	0.4	2.700
76	7.210.000.000			
100	8.085.000.000			

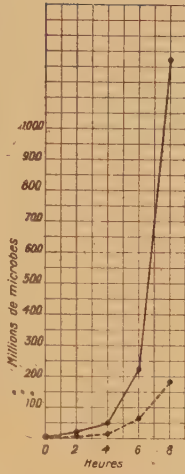
Microbes capables de se reproduire

0	310.000	5.49		
2	380.000	5.57	0.26	460
4	5.280.000	6.72	3.8	31
6	61.000.000	7.78	3.5	34
8	180.000.000	8.25	1.6	75
24	3.500.000.000	9.54	4.3	223
30	4.460.000.000	9.66	0.4	900
48	2.200.000.000			
76	800.000.000			
100	171.000.000			
144	70.000.000			
192	14.520.000			
248	24.200			
312	0			

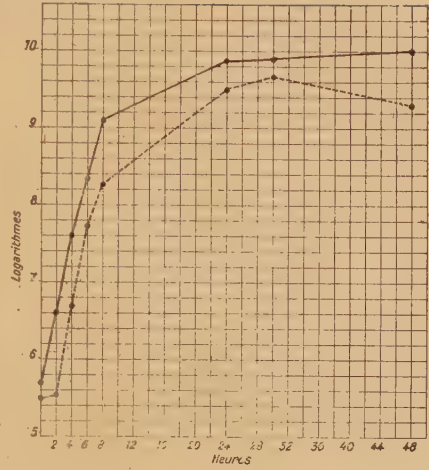
Expérience B³



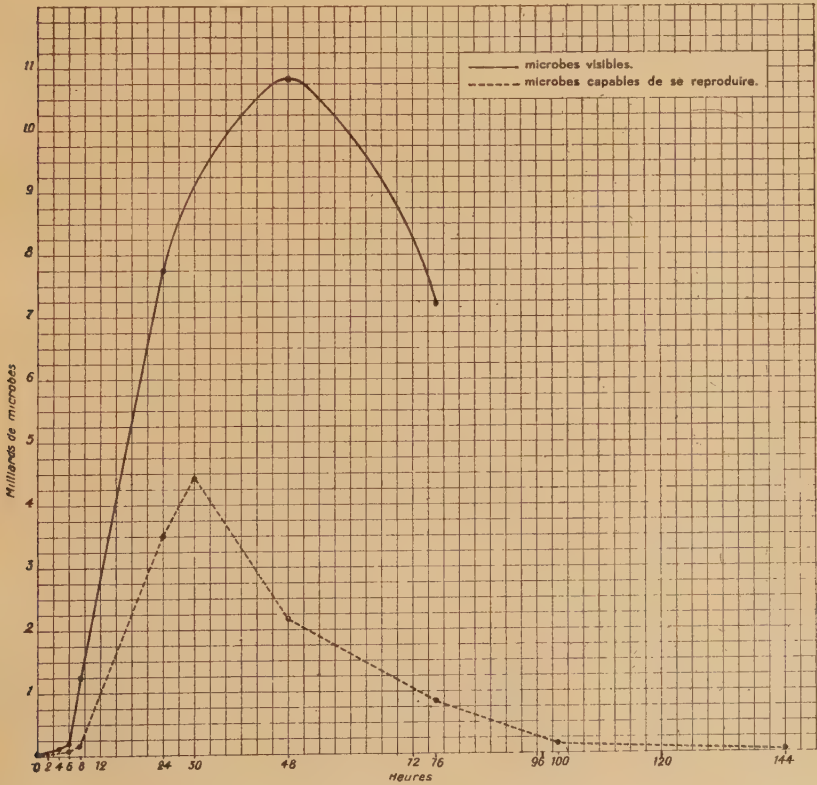
Courbes
des nombres de
microbes pendant
les 4 premières heures



Courbes
des nombres de
microbes pendant
les 8 premières heures



Courbes
des logarithmes des nombres
de microbes



Courbe générale de la poussée

RÉSULTATS OBTENUS

Nous avons exposé en détail la marche d'une de nos expériences.

Pour toutes les autres expériences, nous donnerons seulement les chiffres obtenus.

Certaines d'entre elles ont été poursuivies pendant 2 ou 3 semaines, certaines autres n'ont duré que 48 heures.

Nous avons constaté, en effet, que dans les conditions où nous opérons, la phase de déclin se faisait toujours de la même façon, et d'autre part nous nous sommes intéressés surtout à la période de multiplication elle-même, c'est-à-dire à celle qui va du moment de l'ensemencement au moment où le nombre maximum de cellules est atteint. C'est pourquoi il nous a semblé inutile de prolonger toutes les expériences au delà de 48 heures.

Nous avons effectué :

2 expériences A et A¹ en ensemençant **250.000** microbes par cm³.

5 expériences, B, B¹, B², B³, B⁴ en ensemençant **500.000** microbes par cm³.

2 expériences C et C¹ en ensemençant **2.000.000** de microbes par cm³.

2 expériences D et D¹ en ensemençant **10.000.000** de microbes par cm³.

2 expériences E et E¹ en ensemençant **50.000.000** de microbes par cm³.

1 expérience F (1) en ensemençant **250.000.000** de microbes par cm³.

2 expériences G et G¹ en ensemençant **400** et **500.000.000** de microbes par cm³.

1 expérience H en ensemençant **2.000.000.000** de microbes par cm³.

1 expérience I en ensemençant **10.000.000.000** de microbes par cm³.

Ci-après, nous donnerons pour chacune des séries d'expériences A, B, C, D, E, G, les chiffres que nous avons trouvés et les moyennes calculées d'après ces chiffres (2).

(1) L'expérience F a été faite dans des conditions un peu différentes des autres — les prélèvements ont été effectués au bout de 10 h., 13 h., 16 h., 19 h., 36 h.

(2) Nous laissons de côté pour le moment les expériences F, H et I, pour lesquelles nous ne pouvons donner de résultats moyens. Nous aurons plus loin l'occasion d'y revenir, au moment de la discussion des résultats.

Expériences

à 250.000 microbes par cm³

Microbes visibles

Microbes capables de se reproduire

Expérience A		Expérience A ¹		Moyenne	
Heures	Nombre de microbes par cm ³	Heures	Nombre de microbes par cm ³	Heures	Nombre de microbes par cm ³
0	250.000	0	250.000	0	250.000
2	2.550.000	2	1.600.000	2	2.075.000
4	7.100.000	4	11.400.000	4	9.250.000
6	20.000.000	6	71.000.000	6	45.500.000
8	92.000.000	8	220.000.000	8	156.000.000
24	10.076.000.000	24	19.360.000.000	24	14.718.000.000
30	16.445.000.000	30	16.500.000.000	30	16.472.000.000
48	21.890.000.000	48	17.380.000.000	48	19.635.000.000
72	21.550.000.000				
100	21.230.000.000				
0	46.000	0	103.000	0	75.000
2	60.000	2	120.000	2	90.000
4	440.000	4	1.340.000	4	890.000
6	4.300.000	6	30.720.000	6	17.500.000
8	38.500.000	8	90.000.000	8	64.200.000
24	1.200.000.000	24	2.300.000.000	24	1.750.000.000
30	3.560.000.000	30	3.100.000.000	30	3.330.000.000
48	2.300.000.000	48	1.800.000.000	48	2.050.000.000
72	2.000.000.000	76	539.000.000	72	1.269.000.000
100	1.675.000.000	97	330.000.000	100	1.000.000.000
124	458.000.000	124	41.600.000	124	249.000.000
		168	550.000		
		216	6.200		
		240	0		

Expériences à 500.00

Microbes visibles

Expérience B		Expérience B ¹		Expérience B ²	
Heures	Nombre de microbes par cm ³	Heures	Nombre de microbes par cm ³	Heures	Nombre de microbes par cm ³
0	500.000	0	500.000	0	500.000
2	3.200.000	2	3.450.000	2	2.600.000
4	23.000.000	4	11.000.000	4	11.400.000
6	289.000.000	6	58.800.000	6	47.400.000
8	1.130.000.000	8	343.900.000	8	457.000.000
24	8.695.000.000	24	11.825.000.000	24	13.519.000.000
30	11.725.000.000	30	13.640.000.000	30	20.031.000.000
		48	20.882.000.000	52	15.213.000.000
				76	20.400.000.000
				100	9.372.000.000
				167	6.446.000.000
				200	5.890.000.000

Microbes capables de se reproduire

0	250.000	0	300.000	0	210.000
2	443.000	2	400.000	2	180.000
4	12.000.000	4	1.500.000	4	1.060.000
6	64.000.000	6	46.000.000	6	13.000.000
8	256.000.000	8	124.000.000	8	110.000.000
		24	5.400.000.000	24	4.460.000.000
		30	5.600.000.000	30	5.500.000.000
		48	3.660.000.000	52	2.258.000.000
				76	1.730.000.000
				100	726.000.000
				167	44.000.000
				200	6.670.000

microbes par cm³

Expérience B ³		Expérience B ⁴		Moyenne	
Heures	Nombre de microbes par cm ³	Heures	Nombre de microbes par cm ³	Heures	Nombre de microbes par cm ³
0	500.000	0	500.000	0	500.000
2	3.900.000	2	2.520.000	2	3.100.000
4	44.000.000	4	31.000.000	4	24.000.000
6	224.000.000	6	90.000.000	6	140.000.000
8	1.240.000.000	8	190.000.000	8	752.000.000
24	7.766.000.000	24	8.470.000.000	24	10.000.000.000
30	7.755.000.000	30	8.217.000.000	30	12.200.000.000
48	14.582.000.000	48	12.100.000.000	48	15.700.000.000
76	7.210.000.000	72	12.430.000.000	72	13.000.000.000
100	8.085.000.000	96	3.454.000.000	96	6.900.000.000
0	310.000	0	290.000	0	272.000
2	380.000	2	251.000	2	330.000
4	5.280.000	4	4.300.000	4	4.820.000
6	61.000.000	6	46.000.000	6	46.000.000
8	180.000.000	8	407.000.000	8	215.000.000
24	3.500.000.000	24	3.200.000.000	24	4.140.000.000
30	4.660.000.000	30	3.660.000.000	30	4.850.000.000
48	2.200.000.000	48	2.160.000.000	48	2.570.000.000
76	800.000.000	72	1.660.000.000	72	1.390.000.000
100	171.000.000	96	476.000.000	96	457.000.000
144	70.000.000	144	38.000.000	144	50.000.000
192	14.520.000	196	27.640.000	196	16.000.000
240	24.000				
312	0				

Expériences

à 2 millions de microbes par cm³

Microbes visibles

Expérience C		Expérience C ¹		Moyenne	
Heures	Nombre de microbes par cm ³	Heures	Nombre de microbes par cm ³	Heures	Nombre de microbes par cm ³
0	2.000.000	0	2.000.000	0	2.000.000
2	8.400.000	2	7.300.000	2	7.800.000
4	44.500.000	4	75.000.000	4	59.700.000
6	120.000.000	6	430.000.000	6	275.000.000
8	830.000.000	8	1.100.000.000	8	965.000.000
24	8.800.000.000	24	13.750.000.000	24	11.270.000.000
30	10.580.000.000	30	12.397.000.000	30	11.480.000.000
48	14.000.000.000	48	15.400.000.000	48	14.700.000.000
72	13.145.000.000	72	14.800.000.000	72	13.900.000.000
96	13.200.000.000	97	11.231.000.000	96	12.200.000.000
144	9.240.000.000				

Microbes capables de se reproduire

0	1.020.000	0	1.096.000	0	1.058.000
2	880.000	2	1.170.000	2	1.025.000
4	3.500.000	4	31.400.000	4	17.300.000
6	14.600.000	6	142.600.000	6	78.600.000
8	106.000.000	8	722.000.000	8	414.000.000
24	1.800.000.000	24	4.600.000.000	24	3.200.000.000
30	2.020.000.000	30	6.500.000.000	30	4.260.000.000
48	2.013.000.000	48	4.660.000.000	48	3.330.000.000
72	1.830.000.000	72	1.960.000.000	72	1.890.000.000
96	1.000.000.000	97	930.000.000	96	965.000.000
144	816.000.000	144	33.000.000	144	425.000.000
9 j. 216	85.000.000	8 j. 192	70.000	8 j.	42.535.000
16 j.	0	11 j.	0	11 j.	0

Expériences

à 10 millions de microbes par cm³

Microbes visibles

Expérience D		Expérience D ¹		Moyenne	
Heures	Nombre de microbes par cm ³	Heures	Nombre de microbes par cm ³	Heures	Nombre de microbes par cm ³
0	10.000.000	0	10.000.000	0	10.000.000
2	26.900.000	2	40.600.000	2	33.700.000
4	74.000.000	4	96.000.000	4	85.000.000
6	240.000.000	6	314.000.000	6	277.000.000
8	1.041.000.000	8	1.037.000.000	8	1.039.000.000
24	14.410.000.000	24	16.130.000.000	24	15.270.000.000
30	25.000.000.000	30	17.380.000.000	30	21.190.000.000
48	23.600.000.000	48	23.200.000.000	48	23.400.000.000
		72	18.420.000.000	72	
96	22.275.000.000	96	18.200.000.000	96	20.230.000.000
144	13.794.000.000	144	19.000.000.000	144	16.397.000.000

Microbes capables de se reproduire

0	2.870.000	0	2.600.000	0	2.735.000
2	2.540.000	2	3.200.000	2	2.870.000
4	28.000.000	4	36.000.000	4	32.000.000
6	113.000.000	6	186.000.000	6	149.000.000
8	245.000.000	8	560.000.000	8	402.000.000
24	1.800.000.000	24	4.500.000.000	24	3.150.000.000
30	2.800.000.000	30	5.860.000.000	30	4.330.000.000
48	1.200.000.000	48	1.660.000.000	48	1.430.000.000
		72	1.800.000.000		
96	1.441.000.000	96	710.000.000	96	1.075.000.000
6 j. 144	70.000.000	144	14.000.000	144	42.000.000
8 j.	60.000.000	8 j.	6.600	8 j.	30.000.000
11 j.	15.000.000	11 j.	0	11 j.	15.000.000
14 j.	0			14 j.	0

Expériences

à 50 millions de microbes par cm³

Microbes visibles

Expérience E		Expérience E ¹		Moyenne	
Heures	Nombre de microbes par cm ³	Heures	Nombre de microbes par cm ³	Heures	Nombre de microbes par cm ³
0	50.000.000	0	58.800.000	0	54.400.000
2	92.000.000	2	92.900.000	2	92.450.000
4	117.000.000	4	216.000.000	4	166.500.000
6	269.000.000	6	395.000.000	6	332.000.000
8	456.000.000	8	1.347.000.000	8	901.500.000
24	8.370.000.000	24	11.900.000.000	24	10.135.000.000
30	9.180.000.000	32	14.480.000.000	30	11.830.000.000
48	14.850.000.000	53	16.450.000.000	48	15.650.000.000
72	9.680.000.000				

Microbes capables de se reproduire

0	19.300.000	0	52.000.000	0	35.650.000
2	7.000.000	2	68.000.000	2	37.500.000
4	56.000.000	4	153.000.000	4	104.500.000
6	146.000.000	6	316.000.000	6	231.000.000
8	683.000.000	8	1.080.000.000	8	881.500.000
24	2.300.000.000	24	2.860.000.000	24	2.580.000.000
30	2.200.000.000				
48	1.300.000.000				
72	930.000.000				
96	860.000.000				
144	624.000.000				
192	113.000.000				
240	24.000.000				
13 j.	0				

Expériences à 500 millions de microbes par cm³

Microbes visibles	Expérience G		Expérience G'		Moyenne	
	Heures	Nombre de microbes par cm ³	Heures	Nombre de microbes par cm ³	Heures	Nombre de microbes par cm ³
	0	420.000.000	0	612.000.000	0	516.000.000
	2	510.000.000	2	913.000.000	2	711.500.000
	4	610.000.000	4	1.230.000.000	4	920.000.000
	6	1.145.000.000	6	1.700.000.000	6	1.420.000.000
	8	2.120.000.000	8	3.610.000.000	8	2.865.000.000
	24	18.700.000.000	24	20.000.000.000	24	19.350.000.000
	30	27.300.000.000	30	17.300.000.000	30	22.300.000.000
	48	26.400.000.000	48	18.100.000.000	48	22.250.000.000
Microbes capables de se reproduire	0	284.000.000	0	594.000.000	0	439.000.000
	2	352.000.000	2	715.000.000	2	533.500.000
	4	473.000.000	4	781.000.000	4	627.000.000
	6	930.000.000	6	2.000.000.000	6	1.465.000.000
	8	2.100.000.000	8	3.200.000.000	8	2.650.000.000
	24	7.400.000.000	24	9.200.000.000	24	8.300.000.000
	30	8.300.000.000	30	11.500.000.000	30	9.900.000.000
	48	1.700.000.000	48	2.000.000.000	48	1.850.000.000

Nous avons établi les courbes des logarithmes des nombres de microbes en fonction du temps, correspondant à ces résultats moyens.

Nous avons complé les intervalles entre les chiffres obtenus par nos prélèvements, en calculant à l'aide de ces courbes les nombres intermédiaires pour chaque période de 2 heures, jusqu'à la 48^e heure.

On trouvera pour chaque série d'expériences :

1°) un tableau donnant le nombre de microbes au début des périodes de 2 heures, le nombre de générations et le temps de génération pendant chacune de ces périodes ;

2°) une courbe des logarithmes des nombres de microbes ;

3°) une courbe des nombres de générations pendant chaque période de 2 heures (1).

(1) Pour que les courbes puissent plus facilement être comparées les unes aux autres, nous avons réuni d'une part les courbes des logarithmes correspondant aux expériences A, B, C, D, E, G (planche I) et d'autre part les courbes des nombres de générations correspondant à ces mêmes expériences (planche II). (On trouvera ces planches page 80.)

Expérience A

Microbes visibles

Heures Périodes de 2 h.	Nombre de microbes par cm ³ (en millions)	Logarithme des nombres de microbes	Nombre de générations pendant chaque période de 2 h.	Temps de génération pendant chaque période (en minutes)
0	0.250	5.39		
2	2	6.30	3	40
4	9	6.95	2.2	54
6	45	7.65	2.3	52
8	160	8.20	1.8	66
10	1.000	9.00	2.6	46
12	3.000	9.47	1.5	80
14	5.000	9.69	0.7	171
16	7.000	9.84	0.5	240
18	9.000	9.95	0.36	330
20	11.000	10.04	0.30	400
22	12.500	10.09	0.16	750
24	13.500	10.13	0.13	900
26	15.000	10.17	0.12	1.000
28	15.800	10.198	0.09	1.300
30	16.500	10.217	0.063	1.900
32	17.200	10.235	0.06	2.000
34	17.800	10.250	0.05	2.400
36	18.300	10.262	0.04	3.000
38	18.700	10.271	0.03	4.000
40	19.000	10.278	0.02	6.000
42	19.250	10.284	0.02	6.000
44	19.500	10.290	0.02	6.000
46	19.600	10.292	0.01	12.000
48	19.600	10.292	0	∞

Ensemencement : 250.000 microbes par cm³

Pas de phase de latence.

Période sensiblement logarithmique de 10 heures.

Maximum vers 20 milliards à la 48^e heure.

Moyenne des temps de génération logarithmiques : 51 minutes.

Temps de génération minimum..... 40 minutes.

Expérience A

Microbes capables de se reproduire sur gélose

Heures Périodes de 2 h.	Nombre de microbes par cm ³ (en millions)	Logarithme des nombres de microbes	Nombre de générations pendant chaque période de 2 h.	Temps de génération pendant chaque période (en minutes)
0	0.075	4.87		
2	0.090	4.95	0.26	460
4	0.890	5.94	3.3	36
6	17.5	7.24	4.3	28
8	64.2	7.80	1.9	63
10	200	8.30	1.6	75
12	400	8.60	1	120
14	600	8.77	0.56	210
16	800	8.90	0.43	280
18	1.000	9	0.33	360
20	1.250	9.09	0.30	400
22	1.500	9.17	0.26	460
24	1.750	9.24	0.23	520
26	2.250	9.35	0.36	330
28	2.800	9.44	0.30	400
30	3.300	9.52	0.26	460

Ensemencement : 75.000 microbes par cm³ (vivants)

Phase de latence de 2 heures.

Période logarithmique de la 2^e à la 8^e heure.

Maximum vers 3 à 4 milliards à la 30^e heure.

Moyenne des temps de génération logarithmiques : 42 minutes.

Temps de génération minimum 28 minutes.

Expérience B

Microbes visibles

Heures Périodes de 2 h.	Nombre de microbes par cm ³ (en millions)	Logarithme des nombres de microbes	Nombre de générations pendant chaque période de 2 h.	Temps de génération pendant chaque période (en minutes)
0	0.500	5.69		
2	3.1	6.49	2.6	46
4	24	7.38	2.9	41
6	140	8.14	2.5	48
8	752	8.87	2.4	50
10	1.400	9.14	0.9	133
12	2.300	9.36	0.7	171
14	3.500	9.54	0.6	200
16	4.500	9.65	0.36	305
18	6.000	9.77	0.4	300
20	7.500	9.87	0.33	360
22	8.800	9.94	0.23	520
24	10.000	10	0.2	630
26	10.900	10.03	0.1	1.200
28	11.700	10.06	0.1	1.200
30	12.400	10.09	0.1	1.200
32	13.000	10.11	0.066	1.800
34	13.600	10.13	0.066	1.800
36	14.000	10.149	0.063	1.850
38	14.600	10.164	0.05	2.400
40	15.000	10.176	0.04	3.000
42	15.300	10.184	0.036	3.050
44	15.500	10.190	0.02	6.000
46	15.600	10.193	0.01	12.000
48	15.700	10.195	0.006	20.000

Ensemencement : 500.000 microbes par cm³

Pas de phase de latence.

Période logarithmique de 8 heures.

Maximum vers 16 milliards à la 48^e heure.

Moyenne des temps de génération logarithmiques : 46 minutes.

Temps de génération minimum..... 41 minutes.

Expérience B

Microbes capables de se reproduire sur gélose

Heures Périodes de 2 h.	Nombre de microbes par cm ³ (en millions)	Logarithme des nombres de microbes	Nombre de générations pendant chaque période de 2 h.	Temps de génération pendant chaque période (en minutes)
0	0.252	5.40		
2	0.330	5.51	0.36	330
4	4.82	6.68	3.9	30
6	46	7.66	3.3	37
8	215	8.33	2.2	54
10	600	8.77	1.4	85
12	1.000	9	0.76	158
14	1.500	9.17	0.56	214
16	2.000	9.30	0.43	279
18	2.600	9.41	0.36	330
20	3.200	9.50	0.30	400
22	3.750	9.57	0.23	521
24	4.140	9.61	0.13	923
26	4.500	9.65	0.13	923
28	4.700	9.67	0.06	2.000
30	4.850	9.68	0.03	4.000

Ensemencement : 252.000 microbes par cm³ (vivants)

Phase de latence de 2 heures.

Phase logarithmique de 2 heures à 8 heures.

Maximum vers 5 milliards à la 30^e heure.

Moyenne des temps de génération logarithmiques : 40 minutes.

Temps de génération minimum..... 30 minutes.

Expérience C

Microbes visibles

Heures Périodes de 2 h.	Nombre de microbes par cm ³ (en millions)	Logarithme des nombres de microbes	Nombre de générations pendant chaque période de 2 h.	Temps de génération pendant chaque période (en minutes)
0	2	6.30	1.9	63
2	7.8	6.89	2.9	41
4	59.7	7.77	2.2	54
6	275	8.43	1.8	66
8	965	8.98	1.0	120
10	2.000	9.30	0.6	200
12	3.200	9.50	0.5	240
14	4.500	9.65	0.4	300
16	6.000	9.77	0.3	400
18	7.300	9.86	0.2	600
20	8.500	9.92	0.2	600
22	9.800	9.99	0.16	750
24	11.000	10.041	0.026	4.600
26	11.200	10.049	0.02	6.000
28	11.350	10.055	0.02	6.000
30	11.500	10.060	0.06	2.000
32	12.000	10.079	0.05	2.400
34	12.500	10.096	0.05	2.400
36	13.000	10.113	0.04	3.000
38	13.400	10.127	0.04	3.000
40	13.800	10.139	0.03	4.000
42	14.100	10.149	0.03	4.000
44	14.400	10.158	0.02	6.000
46	14.600	10.164	0.01	12.000
48	14.700	10.167		

Ensemencement : 2 millions de microbes par cm³

Pas de phase de latence.

Période logarithmique de 8 heures.

Maximum vers 15 milliards à la 48^e heure.

Moyenne des temps de génération logarithmiques : 56 minutes.

Temps de génération minimum..... 41 minutes.

Expérience C

Microbes capables de se reproduire sur gélose

Heures Périodes de 2 h.	Nombre de microbes par cm ³ (en millions)	Logarithme des nombres de microbes	Nombre de générations pendant chaque période de 2 h.	Temps de génération pendant chaque période (en minutes)
0	1.058	6	0	∞
2	1.025	6	4.1	29
4	17.3	7.23	2.2	54
6	78.6	7.89	2.4	50
8	414	8.61	0.9	133
10	750	8.87	0.5	240
12	1.050	9.02	0.46	260
14	1.450	9.16	0.26	460
16	1.750	9.24	0.26	460
18	2.100	9.32	0.23	520
20	2.500	9.39	0.13	920
22	2.750	9.43	0.23	520
24	3.200	9.50	0.16	750
26	3.600	9.55	0.16	750
28	4.000	9.60	0.06	2.000
30	4.260	9.62		

Ensemencement : 1.058.000 microbes par cm³ (vivants)

Pas de phase de latence de 2 heures.

Phase logarithmique de 2 heures à 8 heures.

Maximum vers 4 à 5 milliards à la 30^e heure.

Moyenne des temps de génération logarithmiques : 44 minutes.

Temps de génération minimum..... 29 minutes.

Expérience D

Microbes visibles

Heures Périodes de 2 h.	Nombre de microbes par cm ³ (en millions)	Logarithme des nombres de microbes	Nombre de générations pendant chaque période de 2 h.	Temps de génération pendant chaque période (en minutes)
0	10	7		
2	33.7	7.52	1.7	70
4	80	7.90	1.3	92
6	277	8.44	1.8	66
8	1.039	9.01	1.9	63
10	3.000	9.47	1.5	80
12	5.000	9.69	0.7	171
14	7.000	9.84	0.5	240
16	8.800	9.94	0.3	400
18	10.600	10.02	0.26	460
20	12.200	10.08	0.20	600
22	13.700	10.13	0.16	880
24	15.200	10.18	0.16	880
26	16.800	10.22	0.13	920
28	18.400	10.26	0.13	920
30	20.000	10.30	0.13	920
32	21.000	10.32	0.06	2.000
34	21.500	10.33	0.03	4.000
36	22.000	10.34	0.03	4.000
38	22.400	10.35	0.03	4.000
40	22.700	10.356	0.02	6.000
42	23.100	10.363	0.02	6.000
44	23.360	10.367	0.01	12.000
46	23.400	10.369	0.005	24.000
48	23.400	10.369	0	∞

Ensemencement : 10 millions de microbes par cm³

Pas de phase de latence.

Phase logarithmique de 8 heures.

Maximum vers 23 milliards à la 48^e heure.

Moyenne des temps de génération logarithmiques : 72 minutes.

Temps de génération minimum..... 63 minutes.

Expérience D

Microbes capables de se reproduire sur gélose

Heures Périodes de 2 h.	Nombre de microbes par cm ³ (en millions)	Logarithme des nombres de microbes	Nombre de générations pendant chaque période de 2 h.	Temps de génération pendant chaque période (en minutes)
0	2.73	6.43		
2	2.87	6.45	0.06	2.000
4	32	7.50	3.5	34
6	149	8.17	2.2	54
8	402	8.60	1.4	85
10	750	8.87	0.9	133
12	1.100	9.04	0.6	200
14	1.400	9.14	0.3	400
16	1.800	9.25	0.3	400
18	2.150	9.33	0.26	460
20	2.500	9.39	0.20	600
22	2.850	9.45	0.20	600
24	3.150	9.49	0.13	920
26	3.500	9.54	0.16	750
28	3.900	9.59	0.16	750
30	4.300	9.63	0.13	920

Ensemencement : 2.730.000 microbes par cm³ (vivants)

Phase de latence de 2 heures.

Phase logarithmique de la 2^e à la 8^e heure.

Maximum vers 4 à 5 milliards à la 48^e heure.

Moyenne des temps de génération logarithmiques : 57 minutes.

Temps de génération minimum..... 34 minutes.

Expérience E

Microbes visibles

Heures Périodes de 2 h.	Nombre de microbes par cm ³ (en millions)	Logarithme des nombres de microbes	Nombre de générations pendant chaque période de 2 h.	Temps de génération pendant chaque période (en minutes)
0	54.4	7.73		
2	92.45	7.96	0.7	171
4	166.5	8.22	0.8	150
6	332	8.52	1	120
8	901	8.95	1.3	93
10	2.000	9.30	1.1	109
12	3.400	9.53	0.7	171
14	4.500	9.65	0.4	300
16	5.700	9.75	0.3	400
18	6.800	9.83	0.26	460
20	8.000	9.90	0.23	520
22	9.000	9.95	0.16	750
24	10.000	10	0.16	750
26	11.000	10.04	0.13	920
28	11.800	10.07	0.10	1.200
30	12.500	10.09	0.06	2.000
32	13.000	10.11	0.06	2.000
34	13.500	10.13	0.06	2.000
36	14.000	10.14	0.03	4.000
38	14.400	10.15	0.03	4.000
40	14.700	10.16	0.03	4.000
42	15.000	10.17	0.03	4.000
44	15.200	10.181	0.03	4.000
46	15.400	10.187	0.02	6.000
48	15.600	10.19	0.01	12.000

Ensemencement : 50 millions de microbes par cm³

Pas de phase de latence.

Période logarithmique de 8 heures (ou 10 heures).

Maximum vers 16 milliards à la 48^e heure.

Moyenne des temps de génération logarithmiques : 130 minutes.

Temps de génération minimum..... 93 minutes.

Expérience E

Microbes capables de se reproduire sur gélose

Heures Périodes de 2 h.	Nombre de microbes par cm ³ (en millions)	Logarithme des nombres de microbes	Nombre de générations pendant chaque période de 2 h.	Temps de génération pendant chaque période (en minutes)
0	35.65	7.55		
2	37.0	7.56	0.03	4.000
4	104	8.01	1.5	80
6	231	8.36	1.2	100
8	880	8.94	1.9	63
10	1.100	9.04	0.33	360
12	1.300	9.11	0.23	590
14	1.500	9.17	0.20	600
16	1.700	9.23	0.20	600
18	1.900	9.278	0.16	750
20	2.100	9.32	0.14	850
22	2.350	9.37	0.16	750
24	2.580	9.41	0.13	920

Ensemencement : 35 millions de microbes par cm³ (vivants)

Phase de latence de 2 heures.

Phase logarithmique de la 2^e à la 8^e heure.

Maximum vers 2,5 à 3 milliards à la 24^e heure.

Moyenne des temps de génération logarithmiques : 81 minutes.

Temps de génération minimum..... 63 minutes.

Expérience G

Microbes visibles

Heures Périodes de 2 h.	Nombre de microbes par cm ³ (en millions)	Logarithme des nombres de microbes	Nombre de générations pendant chaque période de 2 h.	Temps de génération pendant chaque période (en minutes)
0	516	8.71		
2	712.5	8.85	0.46	260
4	920	8.96	0.36	330
6	1.422	9.15	0.63	190
8	2.865	9.45	1	120
10	4.500	9.65	0.66	180
12	6.000	9.77	0.4	300
14	7.500	9.88	0.36	330
16	9.900	9.99	0.36	330
18	12.000	10.07	0.26	460
20	14.300	10.15	0.26	460
22	17.000	10.23	0.26	460
24	19.500	10.29	0.20	600
26	20.900	10.32	0.10	1.200
28	22.000	10.34	0.06	2.000
30	22.300	10.348	0.02	6.000
32	22.300	10.348	0	∞

Ensemencement : 500 millions de microbes par cm³

Phase peu rapide de 0 à 4 heures.

Période sensiblement logarithmique de la 4^e à la 10^e heure.

Maximum vers 22 milliards à la 30^e heure.

Moyenne des temps de génération logarithmiques : 210 minutes.

Temps de génération minimum..... 120 minutes.

Expérience G

Microbes capables de se reproduire sur gélose

Heures Période de 2 h.	Nombre de microbes par cm ³ (en millions)	Logarithme des nombres de microbes	Nombre de générations pendant chaque période de 2 h.	Temps de génération pendant chaque période (en minutes)
0	439	8.64		
2	533.5	8.72	0.26	460
4	627	8.79	0.23	520
6	1.465	9.16	1.2	100
8	2.650	9.42	0.86	140
10	3.100	9.49	0.23	520
12	3.800	9.57	0.26	460
14	4.500	9.65	0.26	460
16	5.250	9.72	0.23	520
18	6.000	9.77	0.16	750
20	6.750	9.82	0.16	750
22	7.500	9.87	0.16	750
24	8.300	9.91	0.13	920
26	8.900	9.94	0.10	1.200
28	9.500	9.97	0.10	1.200
30	9.900	9.99	0.06	2.000

Ensemencement : 439 millions de microbes par cm³ (vivants)

Phase de latence de 4 heures.

Phase logarithmique peu nette de la 4^e à la 8^e heure.

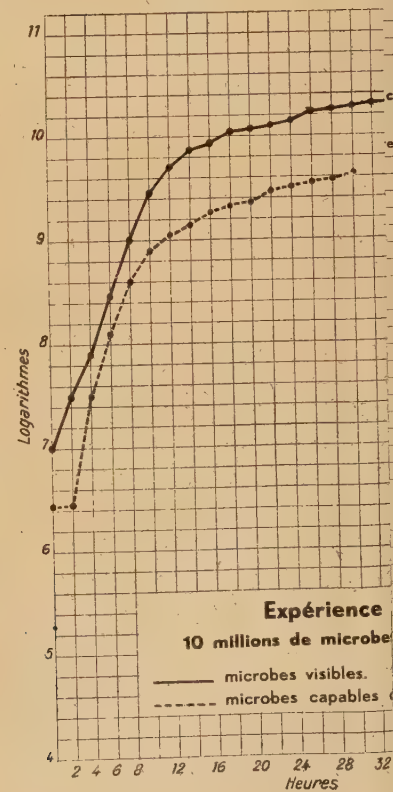
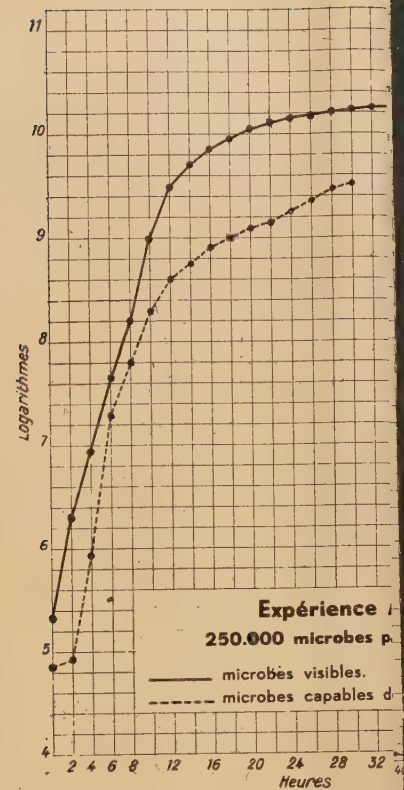
Maximum vers 9 à 10 milliards à la 30^e heure.

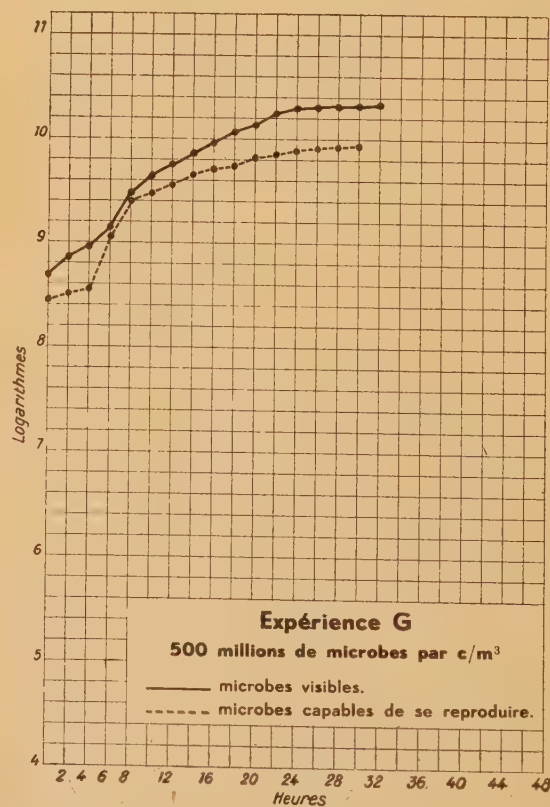
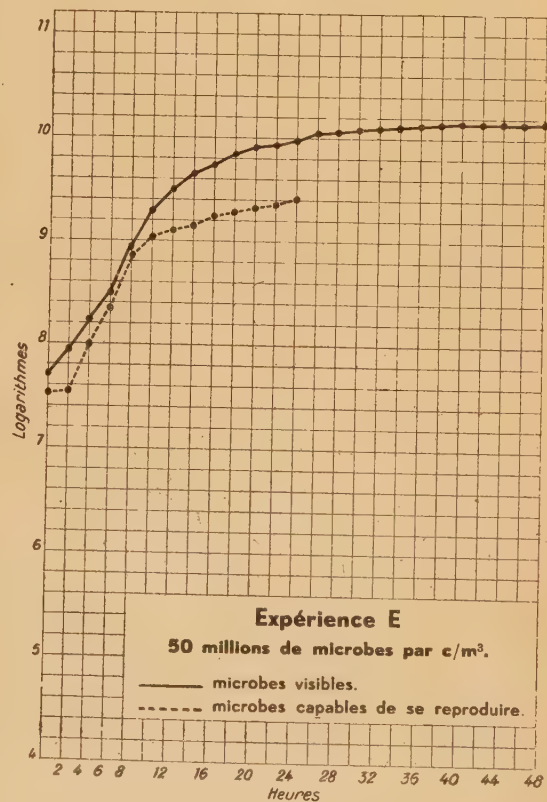
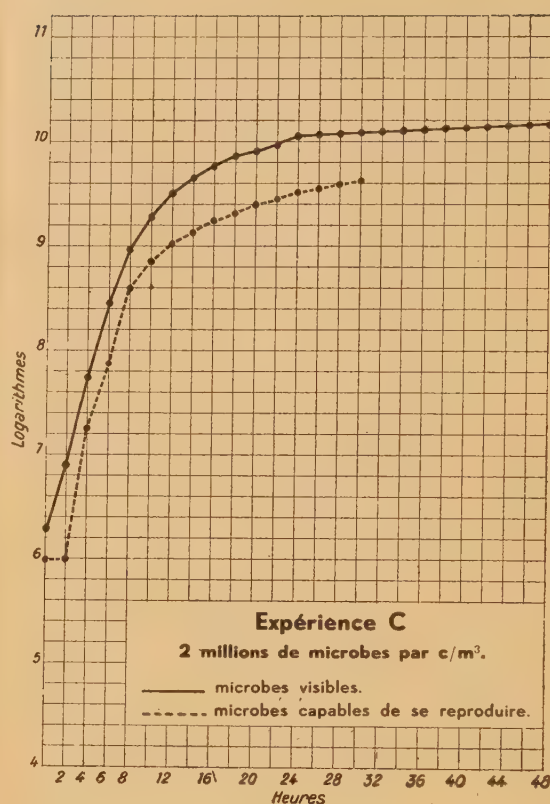
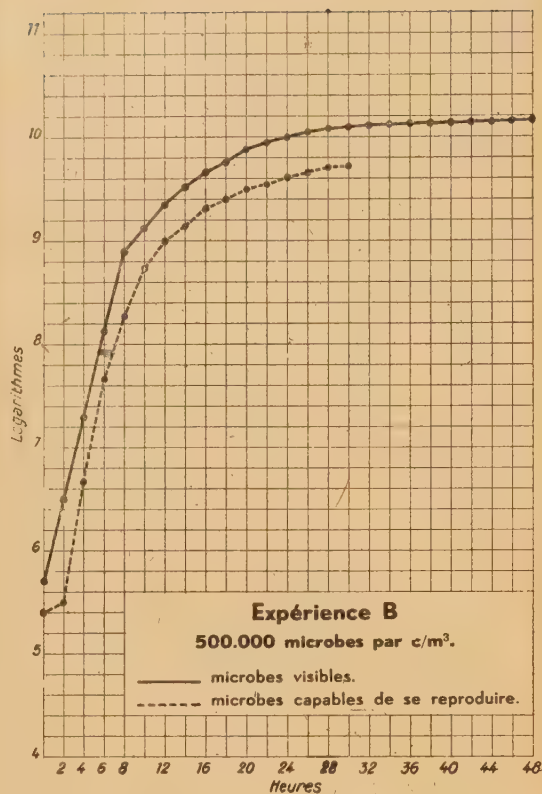
Moyenne des temps de génération logarithmiques : 120 minutes.

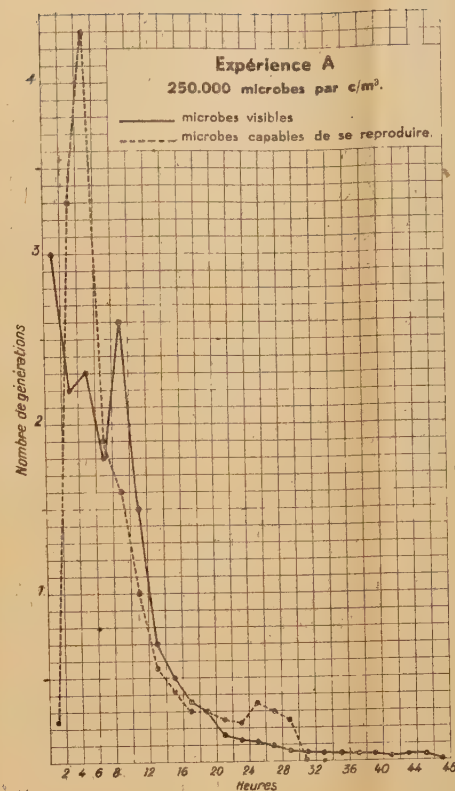
Temps de génération minimum..... 100 minutes.



**Courbes des logarithmes
des nombres de microbes en fonction
du temps.**

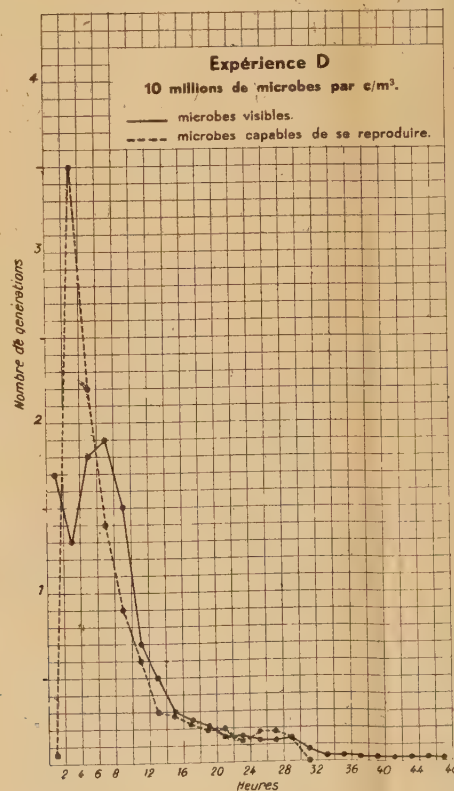


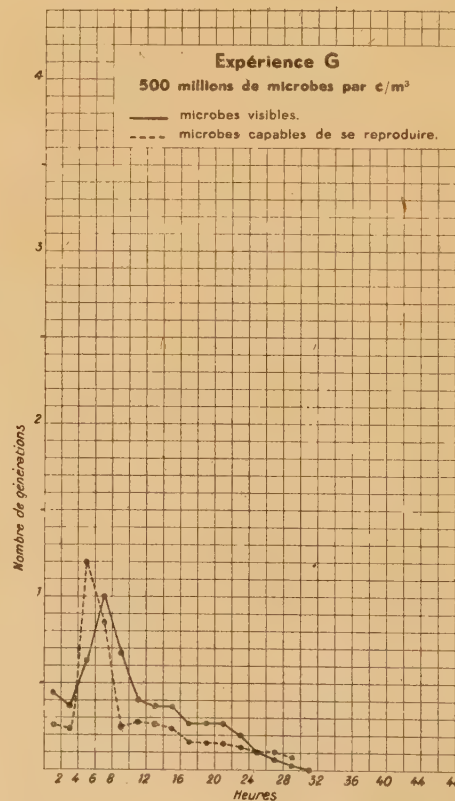
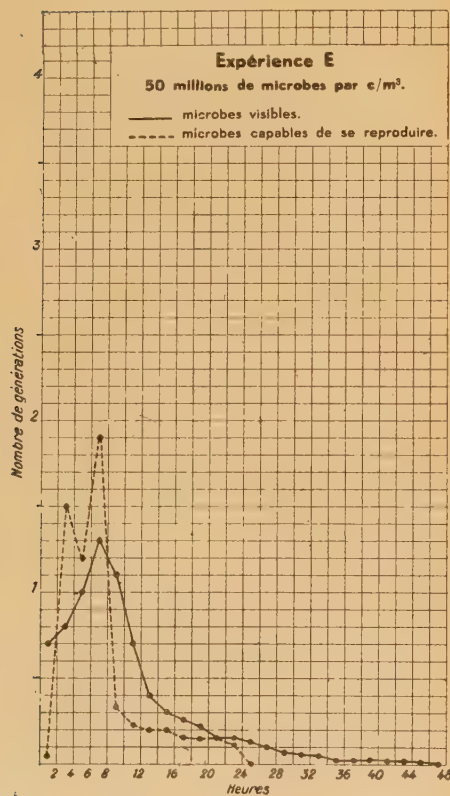
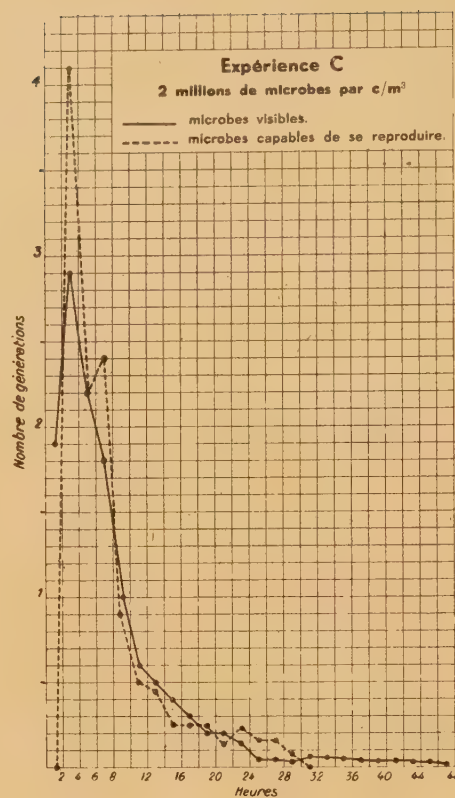
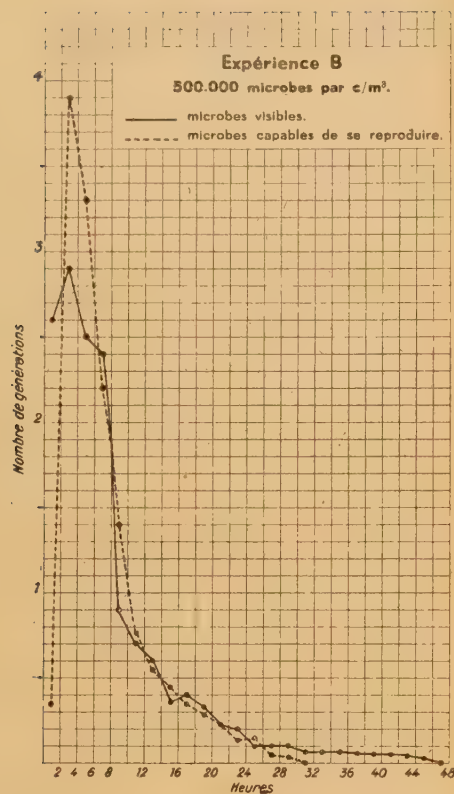




Courbes

**des nombres de générations
en fonction du temps.**





CHAPITRE IV

EXPOSÉ ET DISCUSSION DES RÉSULTATS OBTENUS

Dans une *première partie* nous comparerons les résultats obtenus par les deux méthodes de numération employées. Cette comparaison sera d'autant plus intéressante que de tous les auteurs qui nous ont précédée seuls HEHEWERTH (50) et WILSON (105) ont suivi la poussée microbienne simultanément par les deux méthodes.

Dans une *deuxième partie*, nous montrerons l'influence exercée sur la poussée bactérienne par la variation du nombre de microbes ensemencés.

Enfin, dans une *troisième partie*, nous examinerons les modifications qui se produisent, au cours de la multiplication, dans la morphologie des bactéries.

I. — COMPARAISON DES RÉSULTATS OBTENUS PAR LES DEUX MÉTHODES

1°) La proportion entre le nombre des germes capables de se reproduire sur gélose et le nombre total des germes visibles n'est pas constante, même lorsqu'on se place dans des conditions exactement semblables.

Par exemple, si nous considérons ce rapport au début de chacune de nos expériences, alors qu'il s'agit chaque fois de cultures faites sur bouillons gélosés identiques, et après incubation constante de 24 h., à 37°, nous obtenons les valeurs suivantes :

$$\text{Expérience A : } \frac{75}{250} = 0,30.$$

$$\text{Expérience B : } \frac{250}{500} = 0,50.$$

$$\text{Expérience C : } \frac{1.000}{2.000} = 0,50.$$

$$\text{Expérience D : } \frac{2.730}{10.000} = 0,27.$$

$$\text{Expérience E : } \frac{35.000}{54.000} = 0,64.$$

$$\text{Expérience G : } \frac{439.000}{516.000} = 0,85.$$

Ainsi, sans raison apparente, nous voyons varier le nombre relatif des germes capables de se reproduire sur bouillon gélosé ; comme de toute

évidence ces germes sont les plus vigoureux puisqu'ils sont capables de résister au repiquage dans un milieu neuf solidifié, moins favorable au développement que le milieu liquide, on peut dire que la vitalité microbienne s'est modifiée d'une façon très appréciable.

Ces phénomènes sont d'une grande importance pratique, ne serait-ce qu'au simple point de vue de la conservation des souches, par exemple.

2°) De l'examen, même superficiel des chiffres et des courbes, il apparaît immédiatement que le nombre des microbes visibles a toujours été supérieur au nombre des microbes capables de se reproduire sur bouillon gélosé.

Dans un seul cas, expérience G, le nombre des microbes viables a atteint le nombre des microbes visibles à la 6^e et à la 8^e heures, sans qu'il

Expérience G	Microbes visibles	Microbes vivants
6 ^e heure.....	1.422 millions	1.465 millions
8 ^e heure.....	2.865 millions	2.650 millions

nous soit possible de donner une explication de cette anomalie, cette expérience ayant été conduite très exactement comme toutes les autres.

Nos résultats sont semblables à ceux d'HEHEWERTH (50) et WILSON (105). Ces auteurs ont, en effet, déjà trouvé que le nombre des microbes qu'ils appelaient « viables » est régulièrement plus petit que le nombre des microbes visibles. WILSON a, lui aussi, remarqué que, dans quelques cas très rares, les deux chiffres pouvaient devenir égaux vers la fin de la période logarithmique, sans du reste pouvoir expliquer ce fait.

Nous ne saurions être étonnés que les chiffres fournis par la méthode desensemencements soient plus petits que ceux obtenus par la méthode de numération microscopique.

En effet, la première de ces méthodes compte exclusivement les microbes les plus vigoureux, ceux qui, sortis de leur milieu originel liquide et transplantés sur un milieu solidifié, sont capables de s'y reproduire, malgré l'action néfaste exercée par le repiquage lui-même et les conditions relativement défavorables où se fait la poussée sur le nouveau milieu.

La méthode de numération microscopique compte également ces germes vigoureux ; mais elle évalue en plus les microbes plus fragiles qui, encore capables de se multiplier dans les milieux liquides où ils se trouvent, ne sont plus susceptibles de se reproduire après repiquage sur milieu solidifié par la gélose ; elle compte encore les microbes « morts », incapables de toute reproduction, restés en suspension dans le liquide, et qui sont des microbes « visibles » aussi longtemps que la lyse ne s'est pas produite.

3°) Le chiffre maximum pour les microbes visibles a toujours été obtenu à la 48^e heure, et pour les microbes capables de se reproduire, à la 30^e heure.

Dès la 30^e heure, le nombre des microbes capables de se reproduire sur gélose diminue; alors qu'à ce moment et jusqu'à la 48^e heure, il existe encore des microbes pouvant se multiplier dans le milieu originel. Tout se passe comme si la cause qui intervient pour arrêter la poussée, que ce soit la toxicité du milieu ou le manque d'aliments (1), agissait en plusieurs étapes : diminuant d'abord la vigueur, puis déterminant la mort des bactéries.

D'autre part, la phase à maximum stationnaire dure plus longtemps pour les microbes visibles que pour les microbes capables de se reproduire. Ceux-ci perdent en effet leur vitalité rapidement.

4°) Les courbes obtenues pour les bacilles *capables de se reproduire sur bouillon gélosé* sont en tout point semblables à celles trouvées par l'ensemble des auteurs qui ont étudié la poussée microbienne, à l'aide des numérations sur milieux solidifiés.

Nous avons retrouvé d'une façon constante :

une *phase de latence* d'une durée de 2 heures pendant laquelle les temps de génération sont très grands ;

une *phase de multiplication* logarithmique allant de la 2^e à la 8^e heure et pendant laquelle les temps de génération sont faibles, de durées assez voisines pour être considérées comme sensiblement constantes ;

une *phase de multiplication ralentie* pendant laquelle les temps de génération croissent jusqu'à devenir infiniment grands.

Pour les bacilles dénombrés par la méthode microscopique, nous avons trouvé :

une *phase de multiplication logarithmique* commençant dès l'ensemencement et durant jusqu'à la 8^e ou la 10^e heure environ, pendant laquelle les temps de génération sont faibles et sensiblement constants ;

une *phase de multiplication ralentie* pendant laquelle les temps de génération croissent jusqu'à devenir infiniment grands.

Ainsi, lorsqu'on étudie la multiplication microbienne au moyen de la numération microscopique, on constate que la *phase de latence n'existe pas*. D'emblée commence une multiplication rapide, sensiblement logarithmique ; les microbes, plongés dans un milieu favorable, se divisent immédiatement pour ne donner naissance au début qu'à des individus relativement peu vigoureux, incapables de se reproduire sur un milieu différent de celui dans lequel ils ont pris naissance ; bientôt les nouvelles bactéries deviennent vigoureuses et peuvent se reproduire sur gélose. C'est alors seulement que commence la phase logarithmique pour les microbes que les anciens auteurs considéraient seuls comme « vivants ».

(1) Des récents travaux de R. DAVID (25bis), il semble d'ailleurs résulter que cette cause n'entre pas en jeu pour expliquer le ralentissement et l'arrêt de la poussée. Il est vrai que, en dehors des corps dosés par R. DAVID : C, Az, P., S, Cl, l'épuisement de substances paraissant moins importantes ou d'influence moins connue peut entrer en ligne de compte.

BARBER (5), dans ses expériences conduites de façon très différente, mais qui lui donnaient le nombre total de microbes, avait constaté aussi qu'il n'y avait pas de phase de latence. J. RÉGNIER et S. LAMBIN (84), en 1927, n'avaient pas retrouvé la phase de latence. Nos résultats confirment leurs travaux.

Ainsi, ce phénomène, qui a suscité beaucoup de recherches, et pour lequel on a émis un nombre considérable d'hypothèses, perd-il presque tout son intérêt. La phase de latence n'apparaît que lorsqu'on suit la multiplication microbienne à l'aide des méthodes indirectes donnant le nombre des microbes d'après le nombre des colonies développées sur bouillon gélosé. Ceci prouve simplement que les premières bactéries qui se sont développées aussitôt après l'ensemencement n'ont pu le faire que parce qu'elles étaient plongées dans un milieu favorable où les éléments nutritifs pouvaient leur parvenir facilement, mais qu'elles sont incapables de résister aux dommages causés par la transplantation et surtout incapables de se développer sur milieu solidifié où l'absorption des aliments est évidemment plus difficile.

5°) Les temps de génération minima sont toujours plus grands pour les bacilles visibles que pour les bacilles capables de se reproduire.

Par exemple dans l'expérience B, les temps de génération sont de 41 minutes pour les premiers et de 30 minutes pour les seconds.

Ceci non plus ne saurait nous étonner, puisque nous savons que les bactéries capables de se reproduire sur gélose sont les plus vigoureuses, et puisque, d'autre part, nous comptons parmi les microbes visibles un bon nombre de bactéries mortes incapables de toute reproduction.

6°) La proportion entre les microbes capables de se reproduire sur gélose et les microbes comptés par numération au microscope varie très nettement au cours de la poussée.

Nous avons déjà vu plus haut que le rapport :

$$\frac{\text{microbes capables de se reproduire sur gélose,}}{\text{microbes visibles}}$$

qui est en quelque sorte un rapport de « vitalité », variait pour des prélèvements faits pourtant dans des conditions aussi semblables que possible. Nous allons examiner maintenant les variations de ce rapport au cours de la poussée.

De l'examen des chiffres et des courbes, il apparaît que le rapport de « vitalité » (1) diminue pendant les deux premières heures de la poussée, ce qui est naturel puisque la phase de latence n'existe que pour les microbes dont le nombre figure au numérateur.

(1) Nous employons ce terme pour plus de simplicité. Il ne signifie pas, nous y insistons encore, que le nombre qui figure au numérateur est seul à représenter les microbes vivants, il signifie, dans notre pensée, que ce nombre représente les microbes les plus vigoureux.

Puis le coefficient croît, atteint un certain maximum qui, dans des circonstances exceptionnelles, peut arriver, comme nous l'avons vu, tout près de l'unité ; ensuite ce rapport diminue sensiblement, et enfin très rapidement.

L'heure à laquelle se produit le maximum du rapport de « vitalité » a évidemment pour nous une très grande importance. Pour toutes les expériences bactériologiques, il est en effet nécessaire de prélever les microbes au moment où ils sont le plus vigoureux.

De l'examen de nos expériences et de la comparaison des courbes qui expriment en fonction des heures, la valeur du rapport :

$$\frac{\text{microbes capables de se reproduire sur gélose,}}{\text{totalité des microbes visibles,}}$$

nous pouvons, semble-t-il, conclure que ce maximum se produit pendant la phase logarithmique.

Dans l'expérience A, il a lieu à la 8^e heure,

— — B, — 10^e heure,

— — C, — 8^e heure,

— — D, — 6^e heure,

— — E, — 8^e heure,

comme le montrent les courbes ci-jointes.

Pourtant ce fait a une telle importance pratique, puisqu'il nous conduit à modifier toutes les habitudes bactériologiques, qu'il nous paraît prudent de procéder encore à des vérifications.

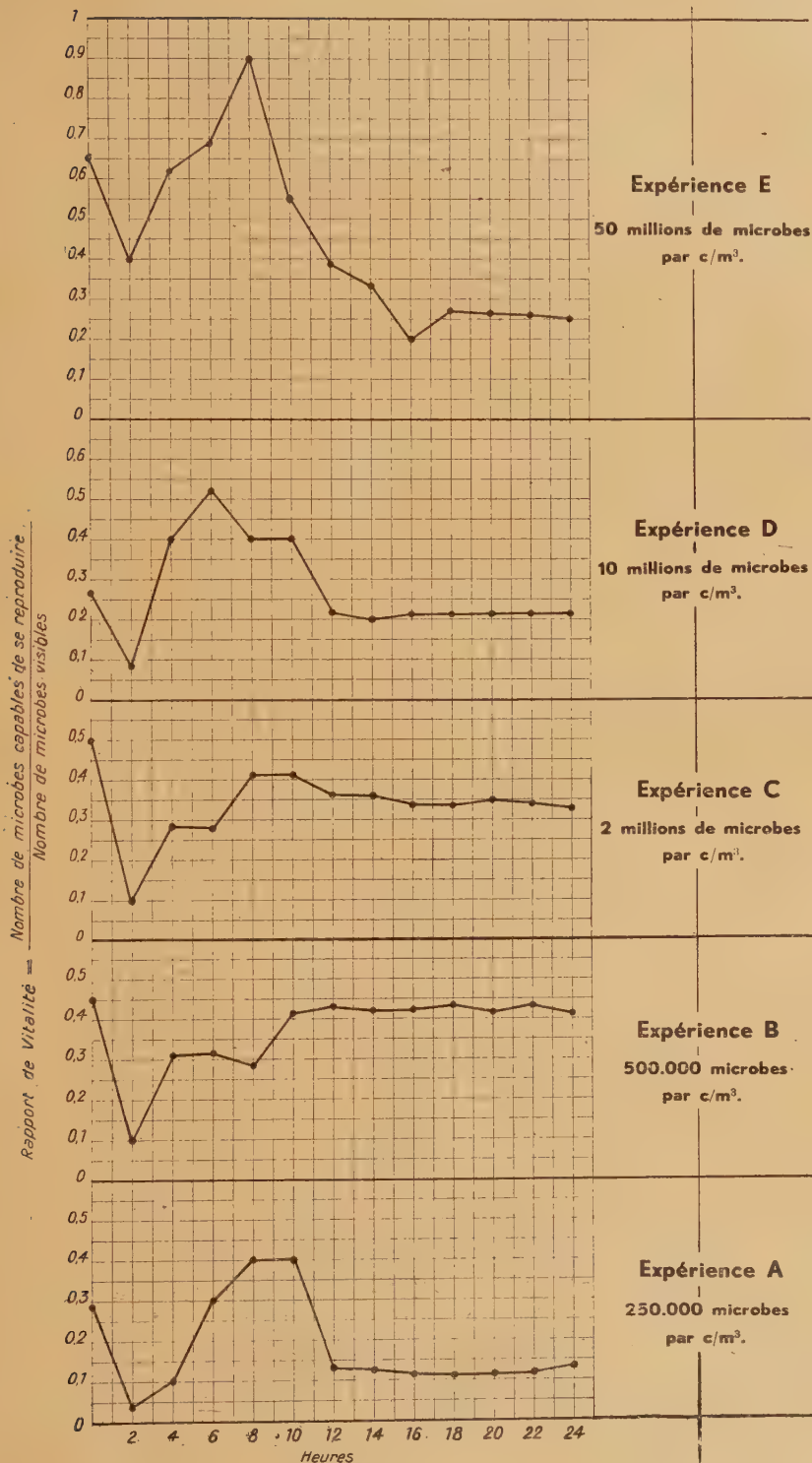
De plus, il est fort possible que la constitution des milieux exerce une grande influence sur ce phénomène:

Quelques-uns des résultats trouvés par R. DAVIN (25 bis) semblent en effet montrer que certains milieux, dans lesquels la multiplication est très rapide, ne permettent pas une conservation longue de la vitalité des micro-organismes, alors que d'autres milieux dans lesquels la poussée n'est pas aussi brillante assurent aux microbes une durée de vitalité plus prolongée.

Ces expériences seront donc reprises ultérieurement sur des milieux de culture autres que le bouillon peptoné salé à l'extrait de viande Liebig, qui a servi pour nos expériences.

Rapport de vitalité = $\frac{\text{Microbes capables de se reproduire sur gélose}}{\text{Microbes visibles}}$

Expérience A		Expérience B		Expérience C		Expérience D		Expérience E	
Heures	Rapport	Heures	Rapport	Heures	Rapport	Heures	Rapport	Heures	Rapport
0	0.29	0	0.5	0	0.5	0	0.27	0	0.65
2	0.04	2	0.1	2	0.1	2	0.08	2	0.40
4	0.1	4	0.31	4	0.28	4	0.40	4	0.62
6	0.3	6	0.32	6	0.28	6	0.52	6	0.69
8	0.4	8	0.28	8	0.42	8	0.40	8	0.90
10	0.41	10	0.42	10	0.41	10	0.40	10	0.55
12	0.13	12	0.43	12	0.36	12	0.22	12	0.38
14	0.12	14	0.42	14	0.36	14	0.20	14	0.33
16	0.11	16	0.42	16	0.34	16	0.21	16	0.20
18	0.11	18	0.43	18	0.34	18	0.21	18	0.27
20	0.11	20	0.42	20	0.35	20	0.21	20	0.26
22	0.12	22	0.43	22	0.34	22	0.21	22	0.26
24	0.13	24	0.41	24	0.33	24	0.21	24	0.25
		26	0.4	26	0.33	26	0.21	26	
		28	0.36	28	0.35	28	0.21	28	
		30	0.33	30	0.34	30	0.21	30	



II. — ÉTUDE DE LA MULTIPLICATION MICROBIENNE EN FONCTION DES NOMBRES DE MICROBES ENSEMENCÉS

1°) *Phase de latence.* — Dans tous les cas, quel que soit le nombre de bactéries ensemencées, nous n'avons pas retrouvé de phase de latence quand nous avons compté les microbes par la méthode microscopique directe. Pourtant, dans l'expérience G à 500 millions, il y aurait peut-être au début de la poussée, une période de 4 heures, pendant laquelle la multiplication est un peu lente.

Pour les microbes vivants, nous avons constamment trouvé une phase de latence de 2 heures ; sauf pour l'expérience G à 500 millions où cette phase a duré 4 heures. Pendant cette phase, le nombre de bactéries a quelquefois augmenté très légèrement, quelquefois aussi il a diminué.

2°) *Phase logarithmique.* — Cette phase commence dès le début de la poussée pour les microbes dénombrés par la méthode microscopique et tout de suite après la phase de latence pour les microbes capables de se reproduire sur bouillon gélosé. Elle dure jusqu'à la 8^e heure, comme il résulte des chiffres trouvés, peut-être même jusqu'à la 10^e heure ou plus, comme il semblerait résulter de l'examen des courbes.

Pour essayer de savoir si vraiment la phase logarithmique s'arrêtait au bout de la 8^e ou 10^e heure, nous avons effectué une expérience (Expérience F), en effectuant des prélèvements 10 h., 13 h., 16 h. et 19 h. après l'ensemencement. Le nombre de microbes ensemencés était de 250 millions.

Expérience F. à 250 millions de microbes par cm³

Microbes visibles		Microbes capables de se reproduire	
Heures	Nombre de microbes par cm ³	Heures	Nombre de microbes par cm ³
0	250.000.000	0	183.000.000
10	4.100.000.000	10	2.800.000.000
13	5.700.000.000	13	3.100.000.000
16	10.000.000.000	16	1.800.000.000
19	9.800.000.000	19	5.300.000.000
36	16.800.000.000	36	6.200.000.000
42	19.500.000.000	42	6.600.000.000
60	24.000.000.000	60	1.270.000.000

De l'examen des chiffres trouvés, il semble bien résulter que l'arrêt de la multiplication logarithmique se fait vers la 10^e heure.

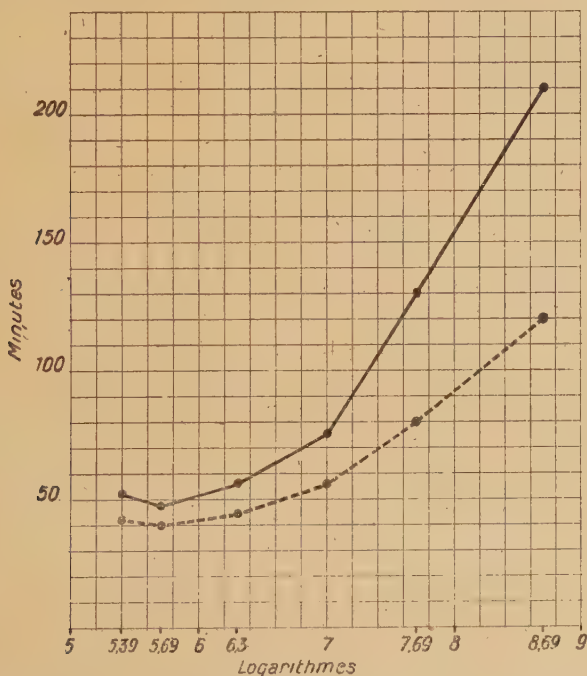
Nous avons déjà vu que les temps de génération logarithmiques étaient toujours plus courts pour les microbes capables de se reproduire que pour les microbes visibles.

Ci-dessous nous donnons un tableau des temps de génération logarithmiques moyens et minima pour les diverses expériences.

	Exp. A		Exp. B		Exp. C		Exp. D		Exp. E		Exp. G	
	250.000 microbes par cm ³		500.000 microbes par cm ³		2 millions de microbes par cm ³		10 millions de microbes par cm ³		50 millions de microbes par cm ³		500 millions de microbes par cm ³	
	Temps de génération		Temps de génération		Temps de génération		Temps de génération		Temps de génération		Temps de génération	
	moyen	minimum	moyen	minimum	moyen	minimum	moyen	minimum	moyen	minimum	moyen	minimum
Microbes visibles...	51	40	46	41	56	41	72	63	130	93	210	120
Microbes capables de se reproduire sur bouillon gélosé...	41	28	40	30	44	29	57	34	81	63	120	100

L'examen de ce tableau est extrêmement intéressant. Les temps de génération augmentent en même temps que les chiffres d'ensemencement.

Ceci est encore plus net si l'on considère la courbe des temps moyens de génération en fonction des logarithmes des nombres de microbesensemencés.



Courbe des temps de génération logarithmiques moyens en fonction des logarithmes des nombres de microbesensemencés.

En somme quand le nombre de microbes à l'ensemencement augmente, il se fait toujours une multiplication logarithmique, mais celle-ci est d'autant plus lente que le nombre de bactéries est plus élevé.

En d'autres termes, le nombre de générations pendant la phase logarithmique diminue, quand augmente l'importance de l'ensemencement. Les courbes des nombres de génération pendant chaque période de 2 heures sont, à ce point de vue, extrêmement parlantes.

3°) *Phase de multiplication ralentie.* — Cette phase se poursuit régulièrement quel que soit le nombre de microbes ensemencés.

Pendant cette phase également les temps de génération augmentent avec le nombre de microbes ensemencés.

Ce phénomène, d'ailleurs, n'est guère sensible qu'au début de la phase, plus tard les temps de génération tendant vers l'infini deviennent tous semblables.

4°) *Phase de maximum stationnaire.* — Il semble *a priori* que le nombre de microbes ensemencés puisse avoir une influence sur le chiffre maximum atteint. En réalité, ce fait n'apparaît pas nettement dans nos expériences. Nous donnons ci-dessous les maxima atteints (en milliards).

	Exp. A.	Exp. B.	Exp. C.	Exp. D.	Exp. E.	Exp. F.	Exp. G.
Microbes visibles....	19.3	15.7	14.6	23.4	15.6	24	22.3
Microbes capables de se reproduire sur gélose.....	3.3	4.8	4.2	4.3	2.5	6.6	9.9

Ces chiffres, quoique étant du même ordre, sont assez irréguliers, variant de 14 à 23 milliards pour les microbes visibles, et de 2,5 à 9,9 milliards pour les microbes capables de se reproduire. Les différences sont sans rapport net avec le nombre de microbes ensemencés. MAC KENDRICK et PAÏ (68) avaient déjà noté que le nombre final atteint dans des cultures de 14 heures était pratiquement indépendant de la grandeur de l'ensemencement.

Il semble pourtant que dans les expériences F (1) et G, effectuées respectivement avec desensemencements de 250 et 500 millions, les nombres maximum atteints, tant pour les microbes visibles que pour les microbes vivants, soient plus élevés que pour les expériences A, B, C, D, E.

Aussi nous a-t-il semblé intéressant de procéder à desensemencements encore plus grands. Une expérience a été faite avec un ensemencement de 2 milliards de bactéries (Exp. H) par cm³ et une autre avec un ensemencement de 10 milliards (Exp. I).

(1) Nous citons ici l'expérience F, quoique effectuée dans des conditions différentes des autres, car ses résultats sont valables pour le point qui nous occupe actuellement.

Ci-joint un tableau donnant les résultats de ces expériences.

Expérience H.

à 2 milliards de microbes par cm³

Heures	Nombre de microbes par cm ³
0	2.170.000.000
2	3.520.000.000
4	4.210.000.000
6	7.100.000.000
8	9.600.000.000
24	23.000.000.000
30	21.000.000.000
48	20.800.000.000
0	2.030.000.000
2	2.230.000.000
4	2.630.000.000
6	3.900.000.000
8	5.800.000.000
24	14.400.000.000
30	18.700.000.000
48	630.000.000

Microbes visibles

Microbes capables de se reproduire

Expérience I

à 10 milliards de microbes par cm³

Heures	Nombre de microbes par cm ³
0	10.770.000.000
2	12.990.000.000
4	13.500.000.000
6	16.600.000.000
8	16.800.000.000
24	25.100.000.000
30	25.200.000.000
48	25.000.000.000
0	4.400.000.000
2	5.100.000.000
4	7.500.000.000
6	7.900.000.000
8	10.000.000.000
24	16.000.000.000
30	13.000.000.000
48	1.900.000.000

Microbes visibles

Microbes capables de se reproduire

Les chiffres maxima sont :

	Exp. H.	Exp. I.
Microbes visibles.	23	25.2
Microbes capables de se reproduire sur bouillon gélosé.....	18.7	16

Ils sont légèrement plus forts pour les microbes visibles et considérablement plus élevés que dans les autres expériences pour les microbes capables de se reproduire sur gélose.

Nous ne nous étendons pas sur ce point, actuellement encore à l'étude au laboratoire de Bactériologie.

L'importance de l'ensemencement n'a guère d'influence sur le moment où le chiffre maximum est atteint : c'est toujours vers la 30^e heure pour les microbes capables de se reproduire sur gélose, et vers la 48^e heure pour les microbes visibles, au moins dans les expériences A, B, C, D, E.

Par contre, dans les expériences G, H, I, où le nombre des microbesensemencés est extrêmement élevé, les maxima sont atteints pour les microbes visibles à la 30^e heure. Ceci paraît normal, puisque les maxima pour cette catégorie de microbes sont toujours du même ordre que pour les expériences précédentes effectuées avec des nombres d'ensemencements plus petits.

Ainsi la densité de la population microbienne, lors de l'ensemencement, influe, non pas sur le nombre maximum atteint, qui est sensiblement constant, mais sur ce qu'on pourrait appeler le pouvoir de reproduction des microorganismes.

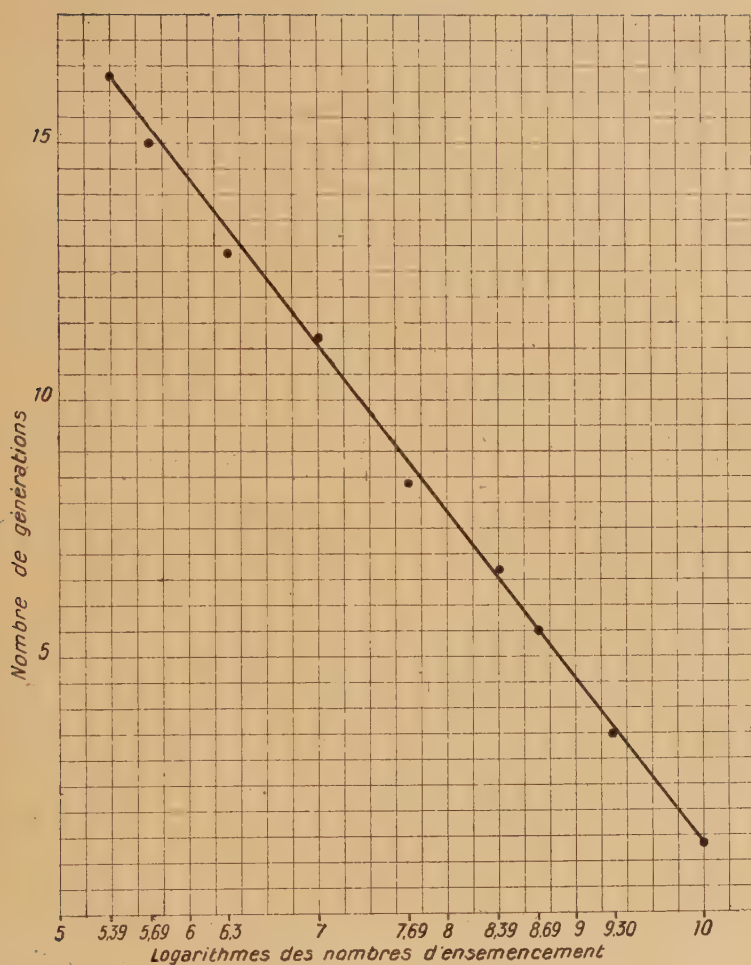
Dans le tableau (1) suivant nous avons indiqué, d'une part, la progéniture *d'une* cellule microbienne, c'est-à-dire le nombre maximum de cellules formées à partir *d'une seule cellule initiale*, et d'autre part le nombre de bipartitions ou nombre de générations nécessaires à la formation de cette progéniture.

Nombre de microbes ensemencés	Nombre maximum de microbes	Progéniture d'une cellule	Nombre de générations
250.000	19.600.000.000	80.000	16.3
500.000	16.300.000.000	33.000	15.0
2.000.000	14.600.000.000	7.300	12.8
10.000.000	23.400.000.000	2.234	11.2
50.000.000	15.600.000.000	312	8.3
250.000.000	24.000.000.000	100	6.6
500.000.000	22.500.000*000	44.5	5.5
2.000.000.000	23.000.000.000	11.5	3.5
10.000.000.000	25.000.000 000	2.5	1.3

Ce tableau nous montre d'une façon très nette que plus le nombre de microbesensemencés croît et plus la progéniture d'une cellule diminue, parallèlement au nombre de générations.

La courbe des nombres de générations en fonction des logarithmes des nombres d'ensemencement (qui est sensiblement une droite) est d'ailleurs extrêmement caractéristique.

(1) Nous nous servons, pour ce tableau, de toutes nos expériences, même des expériences F, H et I.



Influence du nombre de microbes ensemencés sur le nombre de générations accomplies pour atteindre le nombre maximum.

En 1905, A. BROWN (8 bis), étudiant des cultures de levures, plus récemment, en 1925, R. PEARL (77 bis), étudiant l'influence de la densité de la population sur la puissance de reproduction des mouches, avaient obtenu des résultats semblables.

Donc, qu'il s'agisse de bactéries, de levures, ou d'organismes plus élevés tels que des mouches, si la densité de la population est plus forte à l'origine, le pouvoir de reproduction de chaque élément devient plus faible. Il semble qu'une cause semblable intervienne dans tous ces cas, et pour des organismes bien différents, pour empêcher qu'un nombre trop élevé soit atteint. Nous essaierons plus loin de donner une explication de ce phénomène extrêmement curieux et intéressant.

5°) *Phase de mort.* — Nous ne l'avons pas étudiée. Mais il est évident qu'à ce moment le nombre des microbes ensemencés n'a plus la moindre influence.

En résumé, si nous étudions la poussée bactérienne en fonction du nombre des microbes ensemencés, nous constatons les faits suivants :

1°) Pour des ensemencements allant de 250.000 germes à 500 millions par cm^3 , le nombre maximum atteint est légèrement variable, mais toujours du même ordre de grandeur. Il semble en première approximation indépendant de la grandeur du nombre des microbes ensemencés.

2°) Pour ces mêmes ensemencements, la durée de la phase logarithmique est sensiblement constante. Mais le temps moyen de génération pendant cette période, croît en même temps que le nombre des microbes ensemencés.

En somme, dans les conditions de nos expériences, puisque, quel que soit le nombre de microbes ensemencés, les nombres maxima atteints sont du même ordre de grandeur et sont produits sensiblement dans le même temps, il faut bien qu'il y ait ralentissement de la multiplication quand nous ensemençons des nombres élevés de germes. Nous pensions, au début de nos essais, que ce « freinage » se faisait vraisemblablement par raccourcissement, puis suppression, de la phase de multiplication logarithmique avec entrée directe dans la phase de multiplication ralentie.

Ce n'est pas ce que nous avons trouvé. Nous avons constaté que le freinage se faisait d'une toute autre façon : la période logarithmique se maintient aussi longue, mais c'est le rythme de la multiplication, pendant cette période logarithmique, qui devient de plus en plus lent.

Alors que des microbes ensemencés en petit nombre se multiplient, dans les 10 premières heures après l'ensemencement, sur un rythme *constant et rapide*, des microbes ensemencés en plus grand nombre se multiplient, pendant ces mêmes heures, sur un rythme *constant mais lent*.

La raison de ce phénomène paraît assez difficile à comprendre. Si l'hypothèse, envisagée au début de nos recherches, ralentissement de la multiplication par diminution puis suppression de la phase logarithmique, s'était réalisée, il nous eût été possible d'y voir un effet du métabolisme microbien, soit par *disparition progressive* des éléments utiles, soit par *mise en liberté progressive*, du fait de la vie même des microorganismes, de produits de désintégration toxiques. Mais pour expliquer les résultats trouvés, il semble que l'action du métabolisme soit moins capable de nous fournir l'explication nécessaire. En effet, dès la première génération, nous retrouvons le temps plus ou moins long qui caractérisera la période logarithmique. Le ralentissement se fait donc *dès le début*, sans que les vivres aient manqué, sans que les produits nuisibles aient eu le temps de se produire. On pourrait dire que les microbes se mettent d'eux-mêmes au rythme qui convient, comme s'ils savaient qu'il leur faut plus ou moins restreindre leur reproduction.

Nous sommes donc conduits à penser que les microbes apportent en eux-mêmes et, par conséquent, en quantité d'autant plus grande qu'ils sont plus nombreux, les éléments déterminant le freinage.

Peut-être la poussée est-elle ralentie par des principes chimiques apportés par les bactéries elles-mêmes ? Peut-être ce ralentissement est-il

dû à une sorte de gêne produite par des facteurs physiques (charges électriques, par exemple ?). Quoi qu'il en soit, contentons-nous ici de constater le fait et de poser le problème. D'autres travaux, poursuivis en ce moment au laboratoire de Bactériologie, apporteront peut-être l'explication.

III. — MORPHOLOGIE

Au début de notre travail, nous ne pensions pas avoir à nous occuper de la morphologie de la bactérie que nous allions étudier.

C'était un bacille pyocyanique type, de dimensions normales, se colorant bien.

Pourtant nous avons constaté assez rapidement, en examinant les très nombreuses lames préparées pour les numérations, que le bacille pyocyanique présentait des variations morphologiques considérables, les unes très régulières, au début de la multiplication, les autres au contraire très variables pendant la phase de déclin.

Les bactériesensemencées provenant d'une culture sur gélose de 24 heures, sont des bacilles petits, assez réguliers comme dimensions, en général bien colorables.

Sur les lames provenant des prélèvements faits au bout de 2 h., 4 h., 6 h., 8 h., nous observons des bacilles de plus en plus grands, à contours très nets, prenant fortement le colorant, avec de très nombreuses formes en cours de division.

Après 24 heures et 30 heures les bacilles sont redevenus plus petits, ils sont encore bien colorés pour la plupart, quelques-uns pourtant ont déjà un peu perdu le colorant. Il apparaît aussi quelques rares formes d'involution.

Après 48 heures, les bactéries sont plus petites encore, mal colorables, les formes anormales (coccobacilles, filaments) sont plus nombreuses.

Dans les jours suivants, les microbes normaux, dont la taille ne varie plus guère, deviennent de moins en moins nombreux, les formes anormales augmentent au contraire considérablement.

De telle sorte qu'il nous a été le plus souvent impossible de faire des numérations convenables après 5 ou 6 jours.

En somme, nous avons assisté pendant les premières heures de la poussée, à un accroissement considérable de la taille moyenne des bactéries, suivi d'une diminution telle qu'au bout de 24 ou 30 heures, les bacilles pyocyaniques avaient repris l'aspect que nous leur voyons en général.

Ceci a été un phénomène très régulier, que nous avons retrouvé pour toutes nos expériences.

D'autre part, après 48 heures et dans les jours suivants, nous avons constaté des variations morphologiques très grandes, mais variables. Nous avons retrouvé toutes les formes déjà décrites par GUIGNARD et CHARRIN (44), alors qu'il s'agissait de l'action des antiseptiques.

Tout se passait comme si l'accumulation progressive des substances nuisibles dans le milieu, gardé tout ce temps à l'étuve à 37°, agissait de la même façon que des doses croissantes d'antiseptiques.

Nous avons été intéressée surtout par les changements morphologiques des premières heures de la poussée et nous avons tenu à effectuer des mesures.

Nous avons utilisé pour cela un oculaire gradué, que nous avons au préalable étalonné à l'aide d'un micromètre objectif.

Nous avons obtenu les chiffres suivants en μ :

0 heure (moment de l'ensemencement, par conséquent microbes provenant d'une souche de 24 h. sur gélose),

de $1\frac{1}{2}$ ou 1μ à 2μ — $2\mu,5$.
les plus nombreux de 1 à 2μ .

2^e heure. — 1μ à $3\mu,5$,
les plus nombreux de 2 à 3μ ,
les bactéries sont aussi un peu plus larges.

4^e heure. — de 2μ à 4μ — 5μ pour les formes en division,
les plus nombreux de $2\mu,5$ à $3\mu,5$.

6^e heure. — de 2μ à 5μ ,
les plus nombreux de 3μ à 4μ ,
de $4\mu,5$ à $6\mu,5$ pour les formes en division,
les plus nombreuses à 5μ .

8^e heure. — de 2μ à 6μ ,
les plus nombreux de $3\mu,5$ à 4μ ,
de 4μ à $5\mu,5$ pour les formes en division,
les bactéries les plus longues sont moins épaisses.

24^e heure. — de 2μ à 4μ ,
les plus nombreux de 2μ à 3μ ,
les bactéries sont plus trapues et un peu moins bien colorées.

30^e heure. — de 2μ à 4μ — quelques-uns à peine plus petits que 2μ ,
les plus nombreux de 2μ à $2\mu,5$.

48^e heure. — à $1\mu,5$ à $3\mu,5$,
les plus nombreux de 2μ ou un peu moins de 2μ ,
quelques-uns très rares sont plus longs de 7μ — 10μ .

72^e heure. — La plupart sont aux environs de 2μ , plutôt au-dessous,
quelques-uns très rares 3μ et 4μ .

96^e heure. — de 1μ à $2\mu,5$,
les plus nombreux au-dessous de 2μ ,
beaucoup de coccobacilles de 1μ à $1\mu,5$ environ.
Coloration irrégulière.
Sur ces lames, la numération serait très difficile.

6^e jour. — La plupart des microbes sont trop petits pour être mesurés exactement — environ de 1μ à $1\mu,5$ — quelques-uns de 2μ à 3μ peu colorés.

8^e jour. — De 1μ à $1\mu,5$ — quelques rares 2μ et 3μ très peu colorés,
pour beaucoup la membrane seule semble colorée.

43^e jour. — Préparations colorées au gram et au bleu de méthylène.

Très rares bactéries courtes d'aspect normal.

Les autres semblent réduites à la membrane ou à quelques granulations mal colorées.

Nous nous proposons de reprendre cette question et de faire des mesures précises à l'aide de dessins nombreux.

Les chiffres trouvés sont d'accord avec ce que nous avons vu, et d'accord aussi avec les résultats d'autres auteurs.

CLARK et RUEHL (21) (1919) pour les 70 souches bactériennes qu'ils ont étudiées, ont montré que dans les milieux ordinaires les bactéries subissent des changements morphologiques frappants correspondant aux différentes phases de la poussée. « Les jeunes organismes trouvés dans les cultures de 4 à 9 heures sont beaucoup plus grands que les formes trouvées dans les cultures vieilles de 20 ou 24 heures. Dans quelques cas, la différence est si grande qu'elle rend les organismes méconnaissables quand ils sont considérés par rapport au type d'une culture de 24 heures. La période où on trouve les organismes les plus grands correspond à peu près à la période pendant laquelle il se produit une division cellulaire rapide. »

Plus tard, HENRICI (51 à 55) (1921-22-23-24-25-28) a confirmé les résultats de CLARK et RUEHL, et il a étudié plus complètement quelques points. De ses travaux fort intéressants il apparaît, en résumé, que, chez de nombreux genres de bactéries, les cellules des jeunes cultures, pendant la phase logarithmique, atteignent leur taille maxima; elles sont alors de 2 à 6 fois plus grandes que les cellules des cultures de 24 heures d'où elles proviennent. Après la phase logarithmique et jusqu'à la phase stationnaire, les bactéries deviennent graduellement plus petites jusqu'à ce qu'au bout de 24 heures environ on obtienne l'image classique des livres. Après 24 heures ou 48 heures, il se développe des « formes d'involution » colorées irrégulièrement, et les organismes sont en moyenne plus petits que ceux des cultures de 24 heures.

Ainsi nous avons retrouvé, comme les auteurs qui nous ont précédée, un rythme très régulier des variations de taille des bactéries, pendant les premières heures de la poussée, et qui suit le rythme même des phases de la poussée.

Nous avons vu en particulier, les formes très grandes, qui peuvent sembler presque anormales, pendant la phase logarithmique.

Si nous rapprochons ces faits des résultats signalés plus haut, où nous voyons les bactéries les plus vigoureuses devenir de plus en plus nombreuses pendant la phase logarithmique, pour diminuer rapidement de nombre au début de la période de multiplication ralentie, nous sommes conduite à penser que la phase logarithmique, qui est celle, répétons-le, où la multiplication est la plus rapide, a une importance vraiment spéciale.

Tout en rappelant les restrictions que nous avons cru devoir faire plus

haut (voir page 85), il nous semble possible de penser dès maintenant que les microbes prélevés à la période logarithmique ont une vitalité toute particulière.

Nous sommes fort tentée de voir dans ces microbes, qui se multiplient sur un rythme constant et rapide, qui ont des formes plus belles, qui résistent vraisemblablement mieux aux dommages causés par les repiquages, les *éléments microbiens normaux*. Ainsi donc les vieilles habitudes bactériologiques basées sur le rythme solaire, seraient de mauvaises habitudes, comme l'ont déjà signalé CLARK et RUEHL, en considérant simplement les changements morphologiques. N'oublions pas que 10 heures après l'ensemencement, la période logarithmique est terminée ; par conséquent, attendre 24 heures pour faire les prélèvements nous conduit inévitablement à prélever des formes vieilles, dégénérées, se reproduisant mal et de vitalité vraisemblablement affaiblie.

CONCLUSIONS

Nous avons étudié l'influence du nombre de microbes ensemencés sur la multiplication d'un bacille pyocyanique en milieu liquide.

Nous avons suivi l'évolution de la poussée simultanément par les deux méthodes suivantes :

1°) Numération microscopique de tous les microbes visibles ;

2°) Numération sur plaques de gélose des microbes capables de se reproduire dans ces conditions.

Nous avons obtenu les résultats suivants :

1°) Le nombre des microbes comptés par numération microscopique (microbes visibles) est toujours plus élevé que le nombre des microbes capables de se reproduire sur gélose.

2°) Le rapport : $\frac{\text{microbes capables de se reproduire sur gélose}}{\text{totalité des microbes visibles}}$

que nous pouvons considérer comme une sorte de « rapport de vitalité », n'est pas constant.

Il varie d'une expérience à l'autre pour des prélèvements effectués dans des conditions très exactement semblables.

Il varie au cours de la poussée. Il passe par un minimum dans les premières heures après l'ensemencement, puis devient de plus en plus grand, atteignant dans des cas exceptionnels la valeur 1, mais s'arrêtant généralement vers la valeur 0,40 ou 0,50. Le maximum semble atteint vers la fin de la période logarithmique. Le rapport décroît ensuite régulièrement.

3°) Si l'on compte les microbes par numération microscopique, il n'y a pas de phase de latence et la phase logarithmique (période pendant laquelle la multiplication est la plus rapide) commence dès l'ensemencement.

Si l'on compte les microbes par numération sur plaques de gélose, il apparaît une phase de latence, et la phase logarithmique commence immédiatement après la phase de latence.

4°) Pendant la phase logarithmique, les temps de génération sont toujours plus courts pour les microbes capables de se reproduire que pour l'ensemble des microbes visibles.

5°) Quel que soit le nombre des microbes ensemencés (nombre allant de 250.000 à 500 millions de microbes par cm^3), les nombres maxima

atteints, tout en étant assez différents, sont pourtant du même ordre de grandeur :

- de 14 à 23 milliards par cm^3 pour la totalité des microbes visibles,
- de 2,5 à 9 milliards par cm^3 pour les microbes capables de se reproduire sur gélose.

Ces nombres maxima se produisent toujours vers la 48^e heure pour les microbes visibles et vers la 30^e heure pour les microbes capables de se reproduire, tout au moins si nous considérons lesensemencements inférieurs à 500 millions de microbes par cm^3 .

6°) Quel que soit le nombre de microbes ensemencés, la durée de la phase logarithmique est sensiblement constante. Elle diminue toutefois de longueur quand on atteint des ensemencements extrêmement grands.

7°) Le temps moyen de génération pendant la phase logarithmique croît en même temps que le nombre de microbes ensemencés. Ceci est visible pour les microbes comptés *par l'une ou par l'autre méthode*. Ceci revient à dire que le rythme de la multiplication pendant la phase logarithmique devient de plus en plus lent au fur et à mesure que le nombre des microbes ensemencés augmente.

8°) La taille et la forme des bactéries subissent des variations régulières, qui suivent très exactement le rythme de la multiplication.

La longueur maxima, qui est sensiblement 2 à 3 fois plus grande que la longueur des cellules au moment de l'ensemencement, est atteinte vers la fin de la période logarithmique, c'est-à-dire vers la 10^e heure après l'ensemencement.

*
**

De ces faits se dégagent, entre autres, quelques notions qui nous semblent importantes, tant au point de vue pratique qu'au point de vue théorique. Ces notions sont encore intéressantes par les hypothèses de travail qu'elles suggèrent.

1°) Les microbes prélevés dans les conditions de nos essais (conditions normales d'ensemencement), placés dans un milieu liquide et à une température favorable, commencent dès les premières heures à se multiplier. Les microbes formés à ce moment, capables de proliférer dans le milieu liquide où ils ont pris naissance, sont pourtant incapables de se reproduire quand on les transporte sur des milieux solidifiés où les conditions de vie sont plus difficiles. Une phase de latence apparaît donc quand on suit la multiplication microbienne par numération sur milieux solidifiés. En fait, si l'on considère l'ensemble des microbes, *cette phase de latence n'existe pas*.

2°) A partir de la 3^e heure commence une période particulièrement favorable à la vie des microbes : la multiplication est devenue régulière et rapide ; les formes bactériennes s'allongent jusqu'à devenir 2 ou 3 fois plus grandes ; les microbes capables de supporter un transfert sur milieu

solidifié et d'y donner des colonies deviennent de plus en plus nombreux. C'est, croyons-nous, à cette phase, qui ne se prolonge pas au delà de la 10^e heure après l'ensemencement, qu'il conviendrait d'effectuer les prélèvements bactériologiques.

3°) A partir de la 10^e ou de la 12^e heure, la multiplication se ralentit ; les microbes deviennent plus courts, semblables à ce qu'ils étaient au moment de l'ensemencement. Tout au moins pour le bacille pyocyanique et pour le milieu de culture utilisé, les microbes capables de résister au transfert sur milieu solidifié diminuent de nombre plus rapidement que les microbes encore capables de se multiplier dans le milieu liquide où ils ont pris naissance.

Ainsi, dès la 10^e heure, commencent les phases de déclin de la multiplication. Il est donc peu favorable d'effectuer, comme on le fait généralement, les prélèvements à la 24^e heure après l'ensemencement.

4°) Cette phase de déclin de la multiplication peut provenir :

soit de l'épuisement de certains matériaux nutritifs, peut-être parmi ceux que nous considérons comme peu importants,

soit de l'accumulation de matières nuisibles produites par le métabolisme,

soit encore de l'accumulation même des corps microbiens.

Cette dernière hypothèse, non encore envisagée, paraît recevoir un appui des faits curieux suivants :

Le nombre de microbes ensemencés a une influence nette sur le cours de la multiplication. Ainsi, lorsqu'on augmente le nombre des microbes ensemencés, on assiste à un ralentissement de la multiplication. Ce freinage se produit, au moins pour les grandeurs d'ensemencement allant de 250.000 à 500 millions de microbes par cm³, non par un raccourcissement de la phase logarithmique, comme il serait logique de l'admettre, mais par un ralentissement du rythme constant qui règle cette phase.

Dès le début de l'ensemencement, sans qu'il y ait eu vraisemblablement diminution appréciable des produits nutritifs, sans qu'il y ait eu vraisemblablement mise en liberté appréciable de produits nuisibles, les microbes ensemencés en grand nombre ralentissent pour ainsi dire d'eux-mêmes le rythme de leur multiplication.

Il est donc possible que les microbes apportent en eux-mêmes (charge électrique ? ou autre phénomène ?) la cause du ralentissement de la multiplication.

Vu, bon à imprimer :

Vu :

Le Président de la Thèse,

Le Doyen de la Faculté,

RADAIS.

RADAIS.

Vu et permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

S. CHARLÉTY.

BIBLIOGRAPHIE

1. ABDERHALDEN (E.). — Die Verwendung der Gewichtszu- und Abnahme automatischregistrierender Wage. *Fermentforschung*, 1915, t. 1, p. 155 et 229.
2. ALLEN (P. W.). — The attenuation of bacteria due to temperature shock. *Journ. of. Bact.*, 1923, t. 8, p. 555.
3. AVERY (O. T.), GLENN et CULLEN. — Hydrogen ion concentration of cultures of pneumococci of the different types in carbohydrate media. *Journal of experim. Med.*, 1919, t. 30, p. 360.
4. BACHRACH (E. D.). — Accoutumance et anaphylaxie chez le bacille lactique. *Thèse Doct. ès. sc.*, Paris 1924.
5. BARBER (M. A.). — The rate of multiplication of *Bacillus coli* at different temperatures. *Journ. of. Inf. Diseases*, 1908, t. 5, p. 379.
6. BIERNACKI (E.). — Ueber die Eigenschaft der Antiseptica, die Alkoholgährung zu beschleunigen und über gewisse Abhängigkeit ihrer Kraft von der chemischen Baustruktur, der Fermentmenge und der Vereinigung miteinander. *Pflüger's Arch.*, 1891, t. 49, p. 112.
7. BOLAND. — *Inaug. Dissert.*, Amsterdam, 1902 (d'après J. LANE CLAYPON).
8. BREED (R.) et BREW (J.). — Counting bacteria by means of the microscope. *Technical bulletin N° 49. New-York Agricult. Exper. Station*, 1916, p. 1-31 (d'après BUCHANAN et FULMER).
- 8bis. BROWN (A.). — Influences regulating the reproductive function of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journ. Chem. Soc.*, 1905, t. 87, p. 1395.
9. BRUNNER (G.) et ZAWADZKI (A.). — Zählplatte zu den Petri'schen Schalen. *Centralblatt für Bakt. und Par.*, 1893, t. 14, p. 616.
10. BUCHANAN (R. E.). — Life phases in bacterial cultures. *Journ. of inf Diseases*, 1918, t. 23, p. 109.
11. BUCHANAN (R. E.). — Growth curves of bacteria. In *The Newer Knowledge of Bacteriology and Immunology* de JORDAN (E. O.) et FALK (I. S.), Chapitre V, p. 46.
12. BUCHANAN (R. E.) et FULMER (E. J.). — Physiology and Biochemistry of Bacteria, 1 vol., Baillière, Tindall and Cox, London, 1928.
13. BUCHANAN (R. E.) et FULMER (E. J.). — Growth phases and growth rates in cultures of microorganisms, in *Physiology and Biochemistry of Bacteria* chapitre II, p. 4.
14. BÜCHNER (H.), LONGARD (K.) et RIEDLIN (G.). — Ueber die Vermehrungsgeschwindigkeit der Bakterien. *Centralblatt für Bakt. und Par.*, 1887, t. 2, p. 1-6.
15. BURGESS (K. E.). — The toxicity towards staphylococcus of dilute phenol solutions containing sodium benzoate. *Journ. of Phys. Chem.*, 1920, t. 24, p. 738.
16. CARDOT (Ch.) et CARDOT (H.). — Analogie entre les ferments lactiques et les streptocoques au point de vue de l'action des antiseptiques. *C. R. Ac. Sc.*, 1917, t. 165, p. 272.
17. CAPLSON (T.). — Über Geschwindigkeit und Grösze der Hefevermehrung in Würze. *Biochem. Ztschr.*, 1913, t. 57, p. 313.
18. CHESNEY (Alan M.). — The latent period in the growth of bacteria. *Journ. of experim. Med.*, 1916, t. 24, p. 387.
19. CHICK (Miss H.). — The bactericidal properties of blood serum. *Journ. of Hygiene*, 1912, t. 12, p. 414.
20. CLARK (P. F.). — Morphological Changes during the Growth of Bacteria in *New. Knowledge of Bact. and Im.* de JORDAN et FALK, chapitre IV, p. 38.

21. CLARK (P. F.) et RUEHL (W. H.). — Morphological changes during the growth of bacteria. *Journ. of Bact.*, 1919, t. 4, p. 615.
22. COHEN (Barnett) et CLARK (Mansfield). — The growth of certain bacteria in media of different hydrogen ion concentrations. *Journ. of Bact.*, 1919, t. 4, p. 409.
23. COPLANS (Myer). — Influences affecting the growth of microorganisms. Latency. Inhibition. Mass action. *Journ. of Pathology and Bact.*, 1910, t. 14, p. 1.
24. CRAMER (W.). — Die Wasserversorgung von Zürich und ihr Zusammenhang mit der Typhusepidemie des Jahres, 1884. Zurich, 1885 (d'après WINSLOW).
25. GRAMER (E.). — Die Aschebestandteile der Cholerabacillen. *Arch. f. Hyg.*, 1897, t. 28, p. 1-15.
- 25bis. DAVID (R.). — Contribution à l'étude de la multiplication du bacille pyocyanique dans différents milieux de cultures liquides. Influence de la teneur des milieux en certains éléments nutritifs. *Th. Doct. ès sc.*, Paris, 1931, Durand, Chartres, éd. 195 p.
26. DAVISON. — *Journ. Amer. Med. Ass.*, 1916, t. 66, p. 1297 (d'après F. VLÈS).
27. DERBY et AVERY. — The optimum hydrogen ion concentration for the growth of *Pneumococcus*. *Journ. of experim. Med.*, 1918, t. 18, p. 345.
28. DERBY (K. G.). — La concentration optima en ions hydrogène favorisant le développement de certains micro-organismes. *Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1921, t. 35, p. 277.
29. DREYER, DUNCAN et GARDNER. — A general method of estimating the relative turbidity or opacity of fluid suspension including bacterial emulsions. *Biochem. Journ.*, 1916, t. 10, N° 3, p. 399.
30. DREYER (G.). — A simple procedure for the accurate numeration of blood cells and bacteria, without the use of a counting chamber. *The Lancet*, 29 Janvier 1921, t. 200, p. 219.
31. EIJKMAN (C.). — Über thermolabile Stoffwechselprodukte als Ursache der natürlichen Wachstumshemmung der Mikroorganismen. *Centralblatt für Bakt. und Par.*, Originale, 1904, t. 37, p. 436.
32. ELLERMANN et ERLANDSEN. — Technique de numération des colonies visibles (d'après HANS HECKSCHER, *C. R. Soc. Biol.*, 1921, t. 84, p. 1039).
33. ESTY (J. R.) et MEYER (K. F.). — The heat resistance of the spores of *B. botulinus* and allied anaerobies. *Journ. of inf. Diseases*, 1922, t. 31, p. 650.
34. FALK (I. S.). — The role of certain ions in bacterial physiology. A review (Studies on salt action). *Abstr. of bact.*, janvier 1923, t. 7, p. 33.
35. FRASER (C. G.). — The action of methylene-blue and certain other dyes on living and dead yeast. *Journ. of Phys. Chem.*, 1920, t. 24, p. 741.
36. FRASER (C. G.). — Methylene-blue as indicator in determining the toxicity of phenol and phenol-salt solutions towards yeast. *Journ. of Phys. Chem.*, 1921, t. 25, p. 1.
37. FRIES. — Eine einfache Methode zur genauen Bestimmung der Bakterienmengen in Bakteriensuspensionen. *Centralblatt für Bakt., Originale*, 1921, t. 86, p. 90.
38. FULMER (E. I.). — The effect of alcohol on the toxicity of phenol towards yeast. *Journ. of Phys. Chem.*, 1921, t. 25, p. 10.
39. FULMER (E. I.). — The acclimatization of yeast to ammonium fluoride and its reversion in wort. *Journ. of Phys. Chem.*, 1921, t. 25, p. 455.
40. GATES (Fr.). — A method of standardizing bacterial suspensions. *Journ. of experim. Med.*, 1920, t. 31, p. 105.
41. GLYNN (E.), POWEL (M.), REES (A. A.) et COX (G. L.). — Observations upon the standardisation of bacterial vaccines by the Wright, the haemocytometer and the plate culture methods. *Journ. of Pathology and Bact.*, 1913-1914, t. 18, p. 379.

42. GOTSCHLICH et WEIGANG. — Über die Beziehung zwischen Virulenz und Individuenzahl einer Cholerakultur. *Ztschr. für Hygiene*, 1895, t. 20, p. 376.
43. GREENWOOD (M.) et YULE G. UDNY. — On the statistical interpretation of some bacteriological methods employed in wateranalysis. *Journ. Hyg.*, 1917, t. 16, p. 36-54.
44. GUIGNARD (L.) et CHARRIN (A.). — Sur les variations morphologiques des microbes. *Comptes rendus Académie des Sciences*, 1889, t. 105, p. 1192.
45. HARRISON (W. S.). — *Journ. Roy. Inst. Publ. Health*, London 1905, t. 4, p. 313, d'après GLYNN.
46. HARVEY. — The tinturometer. *Ind. Journ. Med. Res.*, 1919, t. 7, p. 346-352 (d'après F. VLÈS).
47. HECKSCHER (Hans). — Méthode pour la numération microscopique des bactéries. *C. R. Soc. Biol.*, 1921, t. 84, p. 1039.
48. HECKSCHER (Hans). — Détermination néphélométrique des émulsions bactériennes. *C. R. Soc. Biol.*, 1921, t. 85, p. 378.
49. HECKSCHER (Hans). — Nouvelle méthode pour la numération des bacilles vivants contenus dans une émulsion. *C. R. Soc. Biol.*, 1921, t. 85, p. 612.
50. HEHEWERTH (F. H.). — Die mikroskopische Zählungsmethode der Bakterien von Alex. Klein, und einige Anwendungen derselben. *Archiv. für Hygiene*, 1901, t. 39, p. 321.
51. HENRICI (A. T.). — A statistical study of the form and growth of a spore bearing bacillus. *Proc. Soc. ex. Biol. and Med.*, 1921, t. 19, p. 132.
52. HENRICI (A. T.). — Differential counting of living and dead cells of bacteria. *Proc. Soc. exp. Biol. and Med.*, 1923, t. 20, p. 293.
53. HENRICI (A. T.). — A statistical study of the form and growth of *Bacterium coli*. *Proc. Soc. exp. Biol. and Med.*, 1923, t. 21, p. 215.
54. HENRICI (A. T.). — Influence of age of parent culture on size of cells of *Bacillus megatherium*. *Proc. Soc. exp. Biol. and Med.*, 1924, t. 21, p. 343.
55. HENRICI (A. T.). — Influence of concentration of nutrients on size of cells of *Bacillus megatherium*. *Proc. Soc. exp. Biol. and Med.*, 1924, t. 21, p. 345.
- 55bis. HENRICI (A. T.). Morphologic variations and the rate of growth of bacteria. 1 vol., 1928, 194 p. Baillière, Tindall et Cox, London.
56. HENRIQUES (O. M.). — Technique de numération des bactéries. *C. R. Soc. Biol.*, 1923, t. 88, p. 819.
57. HESSE (W.). — Über die gasförmigen Stoffwechselprodukte beim Wachstum der Bakterien. *Ztschr. für Hygiene*, 1893, t. 15, p. 17.
58. JORDAN (E. O.) et FALK (I. S.). — The newer knowledge of bacteriology and immunology. 1 vol. *The university of Chicago press*, 1928.
59. KLEIN (Alex). — Eine einfache Methode zur Sporenfärbung. *Centralblatt für Bakt. und Par.*, 1899, t. 25, p. 376.
60. KLEIN (Alex). — Eine neue mikroskopische Zählungsmethode der Bakterien. *Centralblatt für Bakt. und Par.*, 1900, t. 27, p. 834.
61. KLEIN (Alex). — Über die Dosierung der Schutzimpfstoffe. *Berlin. klin. Wochenschrift*, 10 Avril 1916, p. 395-399.
62. LAFAR (Franz). — Eine neue Zählvorrichtung für Plattenkulturen in Petrischalen. *Ztschr. für Nahrungsmitteluntersuchung u. s. w. Wien*, 1893, N° 24, p. 429, d'après *Centralblatt für Bakt. und Par.*, 1894, t. 15, p. 331.
63. LANE CLAYTON (Janet E.). — Multiplication of bacteria and the influence of temperature and some other conditions thereon. *Journ. of Hygiene*, 1919, t. 9, p. 239.
64. LEDINGHAM (J. C.) et PENFOLD (W. J.). — Mathematical analysis of the lag phase in bacterial growth. *Journ. of Hygiene*, 1914, t. 14, p. 242.
65. LUHRIG (H.) et SARTORI (A.). — Gärungshemmungen zuckerhaltigen Lösungen durch Konservierungsmittel. *Pharm. Zentralblatt*, 1908, t. 49, p. 934.

66. MAC CRADY (M. H.). — The numerical interpretation of fermentation tube results. *Journ. of Inf. Diseases*, 1915, t. 17, p. 183.
67. MAC CRADY (M. H.). — Tables for rapid interpretation of fermentation tubes results. *Pub. Health. J. Toronto*, 1918, t. 9, p. 201 (d'après BUCHANAN).
68. MAC KENDRICK et PAI. — The rate of multiplication of microorganisms. A mathematical study. *Proc. Roy. Soc. Edinburgh*, 1911, t. 21, p. 649 (d'après GRAHAM SMITH).
69. MICHAELIS (L.) et MARCORA (F.). — Die Säureproduktivität des *Bacterium coli*. *Ztschr. für Immunitätsforschung und exp. Therapie*, 1912, t. 14, p. 170-173.
70. MILLER. — Einige kurze Notizen in Bezug auf bakteriologische Untersuchungsmethoden. *Centralblatt für Bakt. und Par.*, 1894, t. 15, p. 894.
71. MIQUEL. — Instructions relatives à l'analyse micrographique des eaux. *Revue d'hygiène*, 1887, t. 9, p. 725.
72. MIQUEL. — Manuel pratique d'analyse bactériologique des eaux, 1 vol., Paris, Gauthier-Villars, 1891.
73. MIQUEL (P.) et CAMBIER (R.). — Traité de bactériologie pure et appliquée à la médecine et à l'hygiène, 1 vol. Paris, Naud, 1902.
74. MULLER (Max). — Über den Einfluss von Fiebertemperaturen auf die Wachstumsgeschwindigkeit und die Virulenz des *Typhus Bacillus*. *Ztschr. für Hygiene*, 1895, t. 20, p. 245.
75. NAEGLI et SCHWENDENER. — Das Mikroskop, 2^{te} Aufl., 1877, p. 640 (d'après BUCHNER).
76. NEISSER (Max). — Die mikroskopische Plattenzählung und ihre spezielle Anwendung auf die Zählung von Wasserplatten. *Ztschr. für Hygiene*, 1895, t. 20, p. 118.
77. PAINE (Sidney). — The permeability of the yeast-cell. *Proc. Roy. Soc. of London*, B, 1911-12, t. 84, p. 289-307.
- 77^{bis}. PEARL (R.). — The biology of population growth. Alfred A. Knopf. New York, p. 260.
78. PENFOLD (W. J.). — On the nature of bacterial lag. *Journ. of hygiene*, 1914, t. 14, p. 215.
79. PENFOLD (W. J.) et NORRIS (D.). — The relation of concentration of food supply to the generation time of Bacteria. *Journ. of Hygiène*, 1912, t. 12, p. 527.
80. PORCELLI-TITONE. — *Reforma medica*, t. 31, n° 42 (d'après F. VLÈS).
81. RAHN (Otto). — Ueber den Einfluss der Stoffwechselprodukte auf das Wachstum der Bakterien. *Centralblatt für Bakt. und Par.*, II Abt., 1906, t. 16, p. 417 et 609.
82. REED (H. S.) et REYNOLDS (R. R.). — *Techn. Bull.* 10, Va. Agric. Exper. Sta., 1916 (d'après WINSLOW).
83. REGNARD (P.). — Appareil destiné à enregistrer sous forme de courbe continue les phénomènes de la fermentation. *C. R. Soc. Biol.*, 1882, t. 4, p. 459.
84. REGNIER (J.) et LAMBIN (S.). — Introduction à l'étude des antiseptiques. Etude numérique du croît d'un bacille pyocyanique dans un milieu de culture liquide. *Bull. Sc. Pharmacol.*, 1927, t. 34, p. 401 et 490.
85. RETTGER (Léo T.). — The science of bacteriology and its relation to other sciences. *Journ. of Bact.*, 1918, t. 3, p. 203.
86. RICHT (Ch.) et CARDOT (H.). — Influence d'élévations thermiques faibles et brèves sur la marche des fermentations. *C. R. Ac. Sc.*, 1916, t. 163, p. 954.
87. ROBERT (Léop.). — Diaphanomètre. *C. R. Soc. Biol.*, 1921, t. 84, p. 820.
88. ROBERTSON (T. B.). — Reproduction in cell-communities. *Journ. of physiology*, 1922, t. 56, p. 403.
89. SABOURAUD. — Méthode de Sabouraud pour la préparation des vaccins staphylococciques (d'après CALMETTE, NÈGRE et BOQUET, p. 531).

90. SCHULTZ (E.). — Ein Apparat zur graphischen Darstellung von Gärungsvorgängen. *Pflügers Archiv. für d. ges. Phys.*, 1907, t. 120, p. 51.
- 90bis. SELTER (Hugo). — Infektionversuche mit kleinen Tuberkelbacillenmengen mit besonderer Berücksichtigung des Inhalationsweges. *Deut. med. Woch.*, 1916, p. 593.
91. SHERMAN (J. M.) et HOLM (G. E.). — Salt effects in bacterial growth. *Journ. of Bact.*, 1921, t. 6, p. 511.
92. SHERMAN (J. M.) et HOLM (G. E.). — Salt effects in bacterial growth. II. The growth of *Bact. coli* in relation to H-ion concentration. *Journ. of Bact.*, 1922, t. 7, p. 465.
93. SHERMAN (J. M.), HOLM (G. E.) et ALBUS (W. R.). — Salt effects in bacterial growth. III. Salt effects in relation to the lag period and velocity of growth. *Journ. of Bact.*, 1922, t. 7, p. 563.
94. SHERMAN (J. M.) et ALBUS (W. R.). — Physiological youth in bacteria. *Journ. of Bact.*, 1923, t. 8, p. 127.
95. SHERMAN (J. M.) et ALBUS (W. R.). — The function of lag in bacterial cultures. *Journ. of Bact.*, 1924, t. 9, p. 303.
96. SLATOR (A.). — The rate of fermentation by growing yeast cells. *Biochem. Journ.*, 1913, t. 7, p. 197.
97. SLATOR (A.). — A note on the lag phase in the growth of microorganisms. *Journ. Hygiène*, 1917, t. 16, p. 100.
98. SLATOR (A.). — Yeast crops and the factors which determine them. *Journ. of Chem. Soc.*, 1921, t. 119, p. 115.
99. SMITH (Graham). — The behaviour of bacteria in fluid cultures as indicated by daily estimates of the numbers of living organisms. *Journ. of Hygiene*, 1920, t. 19, p. 133.
100. STEIN (M. F.). — The interpretation of *B. coli* test results on a numerical and comparative basis as applied to the investigation of water and sewage. *Journ. of Bact.*, 1919, t. 4, p. 243.
101. THONI (J.) et THAYSEN (A. C.). — Experimentelle Untersuchungen zur Feststellung der Mindestzahl von Bacillen, die beim Meerschweinchen noch Tuberkulose hervorruft. *Centralblatt für Bakt. und Par., Originale*, 1915-16, t. 77, p. 308.
102. TROESTER. — Verfahren zum Zählen abgetöteter Bakterien in Aufschwemmungen. *Centralblatt für Bakt. orig.*, 1922, t. 88, p. 252.
103. VLÈS (F.). — Sur la signification des dosages bactériens. *C. R. Soc. Biol.*, 1919, t. 82, p. 373.
104. VLÈS (F.). — Recherches sur quelques propriétés optiques des suspensions biologiques et leur application à l'opacimétrie bactérienne. *Arch. de physique biologique*, 1921, t. 1 p. 189.
105. WILSON (G. S.). — The proportion of viable bacteria in young cultures with especial reference to the technique employed in counting. *Journ. of Bact.*, 1922, t. 7, p. 405.
106. WINSLOW (C. E. A.). — The Rise and Fall of Bacterial Populations in the N. knowledge of bact. and im. de JORDAN et FALK. chap. VI, p. 58.
107. WINSLOW (C. E. A.) et BROOKE (O. R.). — The viability of various species of bacteria in aqueous suspensions. *Journ. of Bact.*, 1927, t. 13, p. 235.
108. WOLMAN (A.) et WEAVER (H. L.). — A modification of the Mac Crady method of the numerical interpretation of fermentation tube results. *Journ. of inf. Diseases*, 1917, t. 21, p. 287.
109. WRIGHT (A. E.). — *The Lancet*, London, 1902, t. 2, p. 11.
110. WRIGHT (A. E.). — Technique of the Test and Capillary glass tube. London, Constable and Co, 1912.
111. ZEISZLER (J.). — Binokulares Plattenkulturmikroskop. *Centralblatt für Bakt. and Par., Originale*, 1922, t. 88, p. 430.
112. ZELIKOW (J.). — Quantitative Bestimmung der Bakterialmasse durch die Kolorimetrische Methode. *Centralblatt für Bakt. und Par., Originale*, 1906, t. 42, p. 570.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	11
--------------------	----

CHAPITRE I

TECHNIQUES UTILISÉES POUR L'ÉTUDE QUANTITATIVE DE LA POUSSEE BACTÉRIENNE

I. — <i>Méthodes donnant le nombre total des microbes morts et vivants présents dans la culture</i>	15
a) Mesure des volumes des masses microbiennes.....	15
b) Mesure du poids des masses microbiennes.....	16
c) Evaluation du trouble apporté aux milieux liquides par la masse microbienne	16
d) Evaluation de la quantité de colorant absorbée par les organismes microbiens	17
e) Numération microscopique des éléments microbiens.....	18
1°) Numération microscopique directe.....	18
2°) Numération microscopique indirecte.....	20
II. — <i>Méthodes donnant le nombre des microbes appelés « vivants » par les auteurs</i>	22
a) Numération après dilution et ensemencement en milieu liquide..	23
b) Numération après dilution et ensemencement sur milieux solidifiés	24
c) Numération microscopique des bactéries « vivantes ».....	26
III. — <i>Méthodes basées sur l'activité biochimique des bactéries</i>	27
IV. — <i>Méthodes que nous avons utilisées pour l'étude de la multiplication microbienne</i>	28

CHAPITRE II

ÉTUDE NUMÉRIQUE DE LA POUSSEE MICROBIENNE

— Exposé des travaux effectués pour l'étude de la poussée microbienne.	29
— Vue d'ensemble de la poussée microbienne telle qu'elle résulte des travaux exposés.....	42
I. Phase de latence.....	43
II. Phase logarithmique.....	45
III. Phase de multiplication ralentie.....	47
IV. Phase de maximum stationnaire.....	47
V. Phase de destruction des bactéries.....	48

CHAPITRE III

ESSAIS PERSONNELS. — METHODES EMPLOYÉES. RÉSULTATS OBTENUS

— Microbe utilisé.....	50
— Milieux de culture.....	50
— Méthode de numération des colonies sur plaques de gélose.....	51
— Méthode de numération microscopique indirecte.....	52
— Marche suivie pour nos expériences.....	53
— Résultats, tableaux, courbes.....	54

CHAPITRE IV

EXPOSÉ ET DISCUSSION DES RÉSULTATS OBTENUS

I. — Comparaison des résultats obtenus par les deux méthodes de numération	81
II. — Etude de la multiplication microbienne en fonction des nombres de microbesensemencés.....	88
III. — Morphologie.....	95
CONCLUSIONS	99
BIBLIOGRAPHIE	103
